

Studien zur Gewinnung und Verwendung eines festkörperfixierten Enzyms

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Klaus Ulrich Schlesinger
aus
Maulburg/Baden (BRD)

Basel 1973

Studien zur Gewinnung und Verwendung eines festkörperfixierten Enzyms

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Klaus Ulrich Schlesinger
aus
Maulburg/Baden (BRD)

Basel 1973

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät auf Antrag der Herren:

Prof. Dr. Ch. Tamm

Prof. Dr. M. Brenner

Basel, den 19. Juni 1973

Prof. Dr. M. Eichler
Dekan



Druck: Dezember 1973

Geheimnisvoll am lichten Tag
Läßt sich Natur des Schleiers nicht berauben,
Und was sie deinem Geist nicht offenbaren mag,
Das zwingst du ihr nicht ab mit Hebeln und mit
Schrauben.

J.W. Goethe

Faust I

VORWORT

Während der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation am Institut für Organische Chemie der Universität Basel durfte ich mancherlei Hilfe in Anspruch nehmen; dafür möchte ich meinen Dank abstaten.

Besonders verpflichtet bin ich Herrn Prof. M. Brenner für die Wahl des Themas, sein ständiges Interesse an der Arbeit sowie seine hilfreichen Anregungen. Auch für das vermittelte Stipendium möchte ich ihm danken.

Meinen Dank möchte ich ebenfalls Herrn Dr. P. Fankhauser, Fr. I. Greder sowie den Angestellten des Organisch-chemischen Institutes aussprechen. Auch ihre Hilfe trug zum Gelingen der Arbeit bei.

Maulburg, Juni 1973

Ulrich Schlesinger

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen	1
Einleitung	2
1. Charakterisierung des nicht trägergebundenen, wasserlöslichen Enzyms	6
1.1 Katalytische Eigenschaften und Wahl des Substrats	6
1.2 Dialyse des Rohenzyms	7
1.3 Prüfung der enzymatischen Aktivität mittels DC	7
1.4 Quantitative fluorometrische Verfolgung des enzymatischen Abbaus	8
1.4.1 Reaktion des Dansylchlorids mit Aminosäuren	8
1.4.2 Generelles analytisches Schema	9
1.4.3 Fluorometrische Verfolgung enzymatischer Reaktionen	11
1.5 Kinetische Untersuchungen	13
1.5.1 Michaelis-Menten-Gleichung und Möglichkeiten zur Ermittlung von K_m und v_{max}	13
1.5.2 Auswertung der fluorometrischen Meßdaten	19
1.5.3 Quantitative Verfolgung der Enzymreaktionen mit Hilfe der optischen Drehung	22
1.5.3.1 Allgemeines	22
1.5.3.2 Abbaukurven, K_m und v_{max} aus Abbauversuch ohne Fremdpuﬀer	23
1.5.3.3 Ermittlung des pH-Optimums	26
1.5.3.4 K_m bei pH 6,5	28
1.5.3.5 Abbaukurven, K_m und v_{max} bei pH 6,2	29
1.5.3.6 Abbauversuche bei pH 5,7; 8,05 und 8,9	29
1.5.3.7 Denaturiertes Enzym und optische Drehung	31
1.5.4 Diskussion	32

2.	Trägersysteme zur kovalenten Bindung des Enzyms	34
2.1	Hydrophobe Matrix auf Polystyrolbasis	34
2.1.1	Darstellungsmöglichkeiten für Harze mit Sulfochloridgruppen	34
2.1.1.1	Behandlung eines sulfonsauren Ionenaustauschers mit SOCl_2 oder PCl_5	34
2.1.1.2	Behandlung von Polystyrol/DVB mit Chlorsulfonsäure und $\text{ClSO}_3\text{H}/\text{SOCl}_2$	36
2.1.1.3	Analytik	38
2.1.2	Harze mit diazotiertem Benzidin oder Diaminodiphenylmethan als Reaktivgruppe	39
2.1.3	Harze mit Isothiocyanatgruppierung	40
2.1.4	Umsetzung der Harze mit Enzym und Diskussion	41
2.2	Hydrophile Matrix auf Polystyrolbasis	43
2.2.1	Darstellungsmöglichkeiten für Trisharze	43
2.2.1.1	Behandlung von Sulfochloridharzen mit Tris	43
2.2.1.2	Behandlung von Chlormethyl-Polystyrol mit Tris	44
2.2.1.3	BrCN-Umsetzung und Tris-Behandlung von Trisharzen	45
2.2.1.4	Versuche zur Enzymfixierung an BrCN-umgesetzten Trisharzen	47
2.2.2	Polyäthylenglykol-Polystyrol-Harze: Allgemeines und Darstellungsmöglichkeiten	47
2.2.2.1	Verwendung von Triäthylamin als Katalysator	48
2.2.2.2	Verwendung von Na in flüssigem NH_3 und Eigenschaften des Polyäthylenoxid-Polystyrol-Harzes	50
2.2.2.3	Umsetzung mit BrCN + Enzym und Diskussion	52
2.3	Hydrophile Matrix auf vorvernetzter Polysaccharidbasis: Sephadex als Trägermaterial	52
2.3.1	Aktivierung von Sephadex mit BrCN	52
2.3.2	Vorversuch: Aktivierung von Sephadex und Enzymfixierung	55

2.3.3	Serienversuche mit Sephadex	56
2.3.3.1	Analytik	56
2.3.3.2	Ergebnisse der Serienversuche	58
2.4	Native Polysaccharidbasis: Kartoffelstärke als Trägermaterial	59
2.4.1	Struktur und Eigenschaften der Stärke	59
2.4.2	Aktivierungsversuch von unverkleisterter Stärke mit BrCN	59
2.4.3	Verkleisterung der Stärke, Vernetzung und Aktivierung der Amylopektinfraktion mit BrCN und Enzymreaktion	60
2.5	Vernetzung und Aktivierung von Stärke und anderen Polysacchariden mit NaCN und Hypohalogeniten	62
2.5.1	Allgemeines	62
2.5.2	Serienversuche	63
2.5.2.1	Versuche mit Amylopektin und NaOCl	64
2.5.2.2	Versuche mit Amylose und NaOCl	64
2.5.2.3	Versuche mit verkleisterter, unfractionier- ter Stärke	65
2.5.2.4	Versuche mit Stärke, NaCN und Br ₂ , J ₂ und JCN	65
2.5.2.5	Versuche mit Agar und NaCN/NaOCl	66
2.5.2.6	Versuche mit Sepharose	67
2.5.2.7	Versuche mit Dextrin und NaCN/NaOCl	67
2.5.2.8	Versuche mit Cellulose und NaCN/NaOCl	67
3.	Charakterisierung des stärkefixierten Enzyms	69
3.1	Großansatz Stärkeenzym	69
3.2	Enzymaktivität nach Waschungen mit sauren und basischen Puffern	69
3.3	Beständigkeit der Enzymaktivität in Ab- hängigkeit von der Zeit	71

3.4	Auswertung der Abbaukurven	73
3.5	Hemmungsuntersuchungen mit Na-Acetat und Acetyl-D-phenylalanin	74
3.6	Isolierung von L-Phenylalanin und Acetyl-D-phenylalanin	77
3.7	Kinetische Untersuchungen	77
3.7.1	Allgemeines	77
3.7.2	Ermittlung des pH-Optimums der Enzymstärke	80
3.7.3	Versuche zur Bestimmung von K_m und v_{max}	82
3.7.3.1	Abbau bei pH 6,2	82
3.7.3.2	Abbau bei pH 6,5	86

EXPERIMENTELLER TEIL

4.	Dialyse und Lyophilisierung des Enzyms	87
5.	Herstellung von Acetyl-DL-phenylalanin	87
6.	Dünnschichtchromatographie	88
7.	Fluorometrische Versuche	89
7.1	Reproduzierbarkeit	89
7.2	Analytische Bestimmungen	93
7.2.1	Umsetzungen von Proben der Phenylalanin-Eichlösung	93
7.2.2	Umsetzungen von Proben enzymatischer Reaktionslösungen	95
8.	Polarimetrische Versuche	97
8.1	Bestimmung des Enddrehwertes	97
8.2	Abbauversuch mit freiem Enzym (Kinetikuntersuchungen)	99

8.3	Abbauversuche mit stärkefixiertem Enzym	100
8.3.1	Umsetzungen mit Stärkeenzym im Großansatz (Beständigkeitsuntersuchungen)	100
8.3.2	Kinetikuntersuchungen	101
9.	Trägerherstellung	102
9.1	Sulfochloridharze	102
9.1.1	Umsetzung eines Ionenaustauschers mit SOCl_2	102
9.1.2	Umsetzung eines Ionenaustauschers mit PCl_5	102
9.1.3	Umsetzung von Polystyrol mit ClSO_3H und SOCl_2	103
9.1.4	Analytik	103
9.2	Harze mit Arylaminogruppen	104
9.3	Harze mit Isothiocynatgruppen	105
9.4	Trisharze	106
9.4.1	Reaktion von Sulfochloridharzen mit Tris	106
9.4.2	Reaktion von Chlormethylharzen mit Tris	107
9.5	Polyäthylenglykol-Polystyrol-Harze	107
9.5.1	Darstellung unter Verwendung von Triäthyl- amin als Katalysator	107
9.5.2	Darstellung unter Verwendung von Na als Katalysator	108
9.6	Sephadexenzyme	109
9.6.1	Aktivierung von Sephadex mit BrCN , Enzymumsatz	109
9.6.2	Aktivierungs- und Fixierungsverfahren	110
9.7	Vernetzung und Aktivierung von Stärke mit BrCN (Großansatz), Enzymumsatz	111
9.8	Vernetzung und Aktivierung von Stärke mit NaCN/NaOCl	112
10.	Isolierung von L-Phenylalanin und Acetyl-D- phenylalanin	113

Zusammenfassung	115
Literaturverzeichnis	116
Lebenslauf	123

ABKÜRZUNGEN

() Zahlen beziehen sich auf das Literaturverzeichnis

DC Dünnschichtchromatogramm

R.T. Raumtemperatur

h Stunde

t Zeit

mäq. Milliäquivalente

MeOH Methanol

AcOH Essigsäure



Träger

EINLEITUNG

Enzymatische Reaktionen sind in wissenschaftlicher und technologischer Hinsicht von großer Bedeutung. Die meisten Enzyme sind wasserlöslich und können nach beendeter Reaktion nicht zurückgewonnen werden. In den letzten Jahren zeichnet sich jedoch ein Fortschritt ab: die Verwendung trägergebundener Enzyme. Diese "unlöslichen" Enzyme bieten gegenüber der wasserlöslichen Form vor allem folgende Vorteile:

1. erhöhte Stabilität, d.h. Resistenz gegen Denaturierung, was z.B. ein Arbeiten mit erhöhter Temperatur und somit erhöhter Reaktionsgeschwindigkeit erlaubt;
2. Vermeidung von Verunreinigungen der Reaktionslösung mit Protein;
3. lange und wiederholte Verwendbarkeit der Enzyme, z.B. in einer Säule mit Reaktions- und Waschzyklen.

Die nachteilige Erscheinung, daß unlösliche Enzyme meist eine verminderte Aktivität besitzen (9) (10), wird durch die oben genannten Vorteile überkompensiert.

Auch in der analytischen Chemie, z.B. als Enzymelektroden (7) und in der Biochemie als Modelle beim Studium von Zellmembranen, werden festkörperfixierte Enzyme verwendet (8).

Das Prinzip der Fixierung von Eiweißkörpern auf Träger bildet ferner die Grundlage der Affinitätschromatographie, die die Isolation von Inhibitoren (1) (2), die Reinigung von Enzymen (3) (4) sowie die Isolation von Antigenen und Antikörpern (5) (6) ermöglicht.

Sechs Methoden zur Unlöslichmachung von Enzymen lassen sich unterscheiden:

A) Adsorption

Das Enzym wird reversibel nach Art der Chromatographie

an einen Träger gebunden, der z.B. aus Aktivkohle (11), Calciumphosphat (12) oder Collodium (8) besteht. Dieses Verfahren ist jedoch nicht günstig, da leicht Desorptionsprozesse einsetzen und damit Verluste des Enzyms einhergehen können.

B) Fixierung an Ionenaustauscherharze

Die Bindung ist hier elektrostatischer Art, wobei der polyelektrolytische Charakter der Enzymproteine ausgenutzt wird. Als Ionenaustauscherharze werden z.B. D E A E - Cellulose (13) (Anionenaustauscher), C M - Cellulose (14) und Dowex 50 (15) (Kationenaustauscher) verwendet. Dieses Verfahren hat den gleichen Nachteil wie das vorige, da bei Milieuänderung leicht Desorptionsprozesse einsetzen können.

C) Quervernetzung durch bifunktionelle Reagentien

Bei Benutzung von Reagentien mit zwei oder mehr reaktiven Gruppen tritt intermolekulare Quervernetzung der Enzymmoleküle ein, so daß ein dreidimensionales Netzwerk entsteht. Ein viel benutztes Reagens ist Glutaraldehyd (16).

D) Einschluß in einen Träger

Führt man die Polymerisation von Monomeren in Gegenwart eines Enzyms durch, so wird ein Teil des Enzyms zwischen den Polymerpartikeln wie in einem Käfig festgehalten. Benutzt werden gewöhnlich Polyacrylamid-Gele (17), Dextran-Gele (18) oder Nylon (19). Die enzymatische Reaktion findet durch Diffusion des Substrates in den "Käfig" statt, was aber kleine Substratmoleküle voraussetzt.

E) Polymerisation

Bei Benutzung eines geeigneten Reagens polymerisieren die Enzymmoleküle zu einem hochmolekularem Produkt mit verminderter Löslichkeit. Es wurden jedoch nur

native Polymere, wie Cellulose (22, 25, 28, 35, 41, 44) und anorganische Substanzen, wie poröses Glas (67) verwenden. Die Materialien lassen sich in Polyelektrolytträger und elektrisch neutrale Träger einteilen.

Dieser Typ von Enzymharzen hat bisher die größte Bedeutung erlangt. Maximale Enzymaktivität und geringste Enzymverluste vom Träger ("Ausbluten") sind hier am besten gewährleistet.

Zielsetzung

Unlösliche Enzyme haben in der chemischen Industrie bisher wenig Eingang gefunden. Die von Tosa et al. benutzten Säulen mit DEAE Sephadex (68) oder DEAE Cellulose (69), bei denen eine Aminoacylase adsorptiv gebunden war, verloren nach 4 Wochen 40 % an Aktivität.

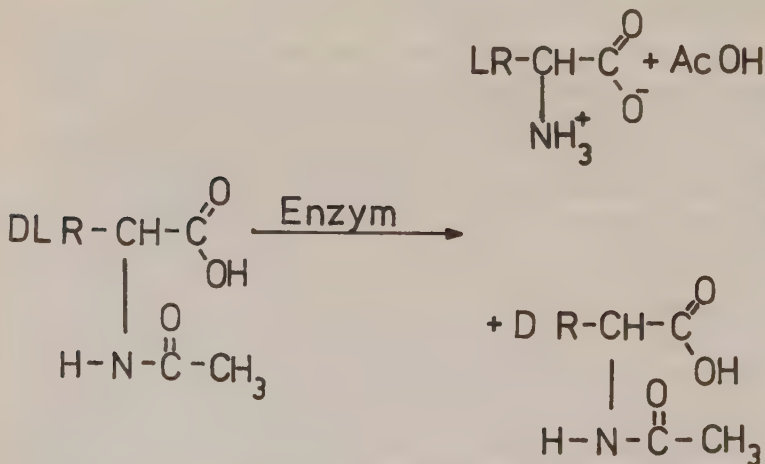
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen für präparative Zwecke geeigneten billigen Träger zu finden, auf den eine Aminoacylase kovalent gebunden werden kann. Dieses Enzympräparat sollte hohe Aktivität, lange Lebensdauer und gute mechanische Eigenschaften besitzen. Daneben waren seine kinetischen Parameter zu ermitteln.

1. Charakterisierung des nicht trägergebundenen, wasserlöslichen Enzyms

1.1 Katalytische Eigenschaften und Wahl des Substrats

Das mir zur Verfügung gestellte Enzym, dessen Struktur und Molekulargewicht unbekannt sind, ist eine im Handel befindliche Aminoacylase; es handelt sich um ein relativ unreines, pulverförmiges, wasserlösliches Präparat.

Läßt man das Enzym bei ungefähr neutralem pH in wäßriger Lösung mit einer racemischen N-Acetyl-aminosäure reagieren, so spaltet das Enzym nur von der L-Form (Substrat) die Acetylgruppe ab; es entstehen eine L-Aminosäure und Acetationen; die N-Acetyl-D-aminosäure bleibt zurück.



Die enzymatische Reaktion läuft somit auf eine Racematspaltung hinaus; die Reaktionsprodukte lassen sich aufgrund verschiedener Löslichkeit leicht isolieren, wobei die Gewinnung der L-Aminosäure von Bedeutung ist.

Acetylphenylalanin ergab die Mischung:

	CHCl ₃	:	MeOH	:	AcOH	:	Pyridin
Volumenteile	70	:	25	:	5	:	5

Phenylalanin ließ sich durch Behandlung mit Ninhydrin-Reagens, Acetylphenylalanin durch Behandlung mit Chlor und Tolidin-Reagens sichtbar machen.

Die Säure Acetyl-DL-phenylalanin wurde mit 2 Äquivalenten NaHCO₃ in H₂O gelöst, wobei das überschüssige Hydrogenkarbonat als Puffer fungierte. Die Lösung war $4,464 \times 10^{-2} \text{ m}$ an Racemat; mit dieser niedrigen Konzentration wurde gearbeitet, um in relativ kurzer Zeit mit wenig Enzym einen hohen Umsatz zu erreichen.

Gleiche Volumina Acetyl-DL-phenylalanin-Lösung und wäßrige Enzymlösung wurden zusammengegeben und bei 40°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitabständen wurden der Lösung Proben entnommen und auf DC aufgetragen. Nach Anfärben mit Ninhydrin ließ sich anhand der Vergleichslösungen erkennen, daß L-Phenylalanin entstanden war, das Enzym somit unter diesen Arbeitsbedingungen Aktivität besitzt. Der pH der Lösung betrug 8.

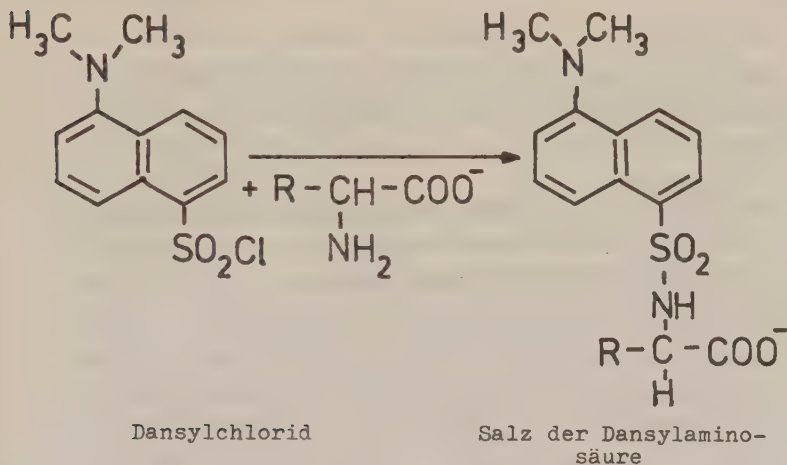
1.4 Quantitative fluorometrische Verfolgung des enzymatischen Abbaus

1.4.1 Reaktion des Dansylchlorids mit Aminosäuren

Zur Ermittlung kinetischer Daten, mit denen das Enzym charakterisiert werden kann, ist ein Verfahren nötig, mit dem sich die enzymatische Reaktion quantitativ verfolgen läßt.

Bei der enzymatischen Reaktion entsteht L-Phenylalanin. Das Fluoreszenzreagens 1-Dimethylamino-naphtalin-5-sulfochlorid, abgekürzt Dansylchlorid, reagiert im basi-

schen Bereich mit Aminosäuren unter Ausbildung einer Sulfonamidbindung (72-74):



In die Aminosäure, in diesem Falle das durch die Reaktion gebildete L-Phenylalanin, ist nun ein fluoreszierender Rest eingeführt worden. Die Fluoreszenz des Dansylphenylalanins ist der ursprünglichen Aminosäurekonzentration proportional, der Proportionalitätsfaktor wird anhand einer Eichlösung bestimmt,

Das Acetyl-phenylalanin reagiert aufgrund seiner durch die Acetylgruppe verminderten Elektronendichte am N-Atom nicht mit der Sulfochloridgruppe des Dansylchlorids.

1.4.2 Generelles analytisches Schema

Das Dansylphenylalanin wurde nicht mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie vom Reaktionsgemisch getrennt (75), um dann die Fluoreszenz des entstandenen Fleckens zu vermessen (76). Es wurde vielmehr mit CHCl_3 partiell extrahiert, die Fluoreszenz der Lösung in der Küvette eines Fluorometers gemessen und mit einer Eichkurve verglichen.

Folgendes quantitative Verfahren erwies sich als geeignet:

- a) Herstellung einer Lösung von L-Phenylalanin.
- b) Umsetzung einer Probe der Eichlösung mit Dansylchlorid (Überschuß) unter Zugabe eines basischen Puffers. Nach beendeter Reaktion liegen folgende Verbindungen vor:
Salz des Dansyl-phenylalanins, überschüssiges Dansylchlorid, Puffersalze und teilweise zur Sulfonatverbindung verseiftes Dansylchlorid.
- c) Entfernung des überschüssigen Dansylchlorids.
Da Dansylchlorid, wie die Dansylaminosäure, fluoresziert, muß es mit CHCl_3 extrahiert werden, wobei die anderen Verbindungen der Reaktionslösung, die alle als Salze vorliegen, in der Lösung zurückbleiben.
- d) Ansäuern der Reaktionslösung auf pH 5, wobei freies Dansyl-phenylalanin entsteht, das durch Verseifung von Dansylchlorid entstandene Sulfonat aber nicht protoniert wird.
- e) Standardisierte, partielle Extraktion des freien Dansyl-phenylalanins mit CHCl_3 und fluorometrische Vermessung des Extraktes.
- f) Aufzeichnung einer Eichkurve und Wiederholung der quantitativen Ermittlungen mit Versuchslösungen unbekannter Konzentrationen an Phenylalanin aus enzymatischen Abbauversuchen.
- g) Auswertung der Fluoreszenzdaten anhand der Eichkurve nach f).

1.4.3 Fluorometrische Verfolgung enzymatischer Reaktionen

a) Reaktion 1

Die Substratkonzentration der Stammlösung betrug $2,232 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Acetyl-L-phenylalanin (vergl. 7.1.a). Die Lösung enthielt $4,464 \cdot 10^{-2}$ Mol/l NaHCO_3 als Puffer, der pH betrug 8.

Gleiche Volumina der Stammlösung und einer wäßrigen Enzymlösung (0,3 mg Enzym/ml) wurden zusammengegeben und bei 40°C inkubiert. Die Substratanfangskonzentration S_0 betrug somit $1,116 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Acetyl-L-phenylalanin. Zu bestimmten Zeiten wurden der Reaktionslösung Proben entnommen und mit Dansylchlorid umgesetzt (vergl. 7.2.2). Beim Einbringen der Proben in die Dansylchloridlösung wird der enzymatische Abbau sofort unterbrochen, da die Lösung Aceton enthält, das denaturierend auf das Enzym wirkt. Denaturierend wirkt auch das Dansylchlorid; außerdem findet bei pH 10 (Pufferlösung) nur sehr geringer enzymatischer Umsatz statt. Die Fluoreszenz der jeweiligen sauren CHCl_3 -Extrakte wurde im Fluorometer gemessen.

b) Reaktion 2

Die Reaktion wurde analog Reaktion 1 durchgeführt, nur mit 6,5 facher Enzymmenge (1,95 mg Enzym/ml Enzymstammlösung).

Die Tabelle 1 zeigt die Auswertung der Meßwerte der Reaktion 1, die Tabelle 2 die der Reaktion 2.

Tabelle 1 (zu Reaktion 1, S. 11)

S_0 (Substratanfangskonzentration): $1,116 \cdot 10^{-2}$ Mol/l
Acetyl-L-phenylalanin

x: Mol/l L-Phenylalanin (Umsatz)

S_t : Substratkonzentration zur Zeit t

Enzymmenge: 0,15 mg/ml Reaktionslösung

t: Zeit in Stunden

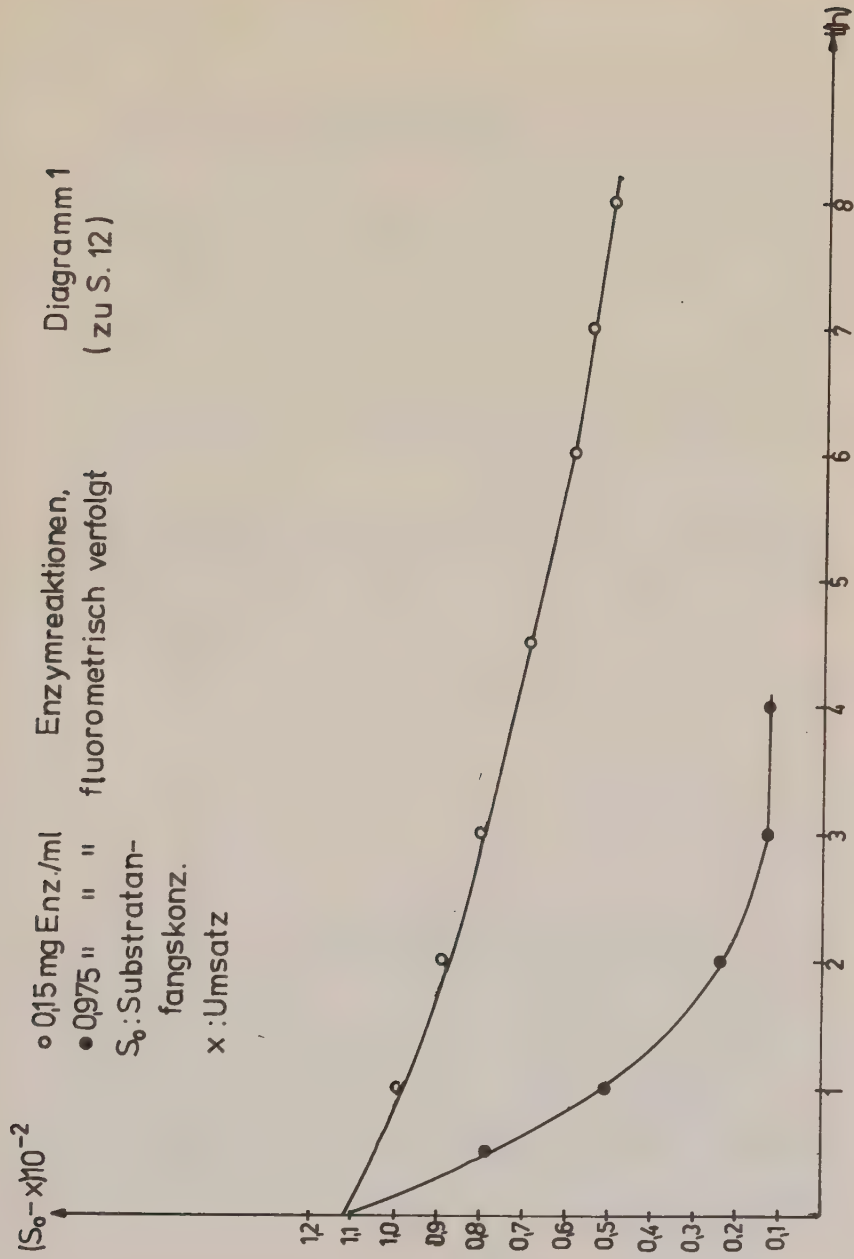
t	x	$S_t = S_0 - x$	% Abbau
1	$0,1135 \cdot 10^{-2}$	$1,0034 \cdot 10^{-2}$	10,2
2	$0,2183 \cdot 10^{-2}$	$0,8976 \cdot 10^{-2}$	19,6
3	$0,3036 \cdot 10^{-2}$	$0,8123 \cdot 10^{-2}$	27,2
4,5	$0,4145 \cdot 10^{-2}$	$0,7014 \cdot 10^{-2}$	37,2
6	$0,514 \cdot 10^{-2}$	$0,6019 \cdot 10^{-2}$	46
7	$0,5545 \cdot 10^{-2}$	$0,5614 \cdot 10^{-2}$	49,7
8	$0,600 \cdot 10^{-2}$	$0,5156 \cdot 10^{-2}$	53,8

Tabelle 2 (zu Reaktion 2, S. 11)

S_0 wie in Tabelle 1 angegeben; Enzymmenge: 0,975 mg/ml
Reaktionslösung

0,5	$0,3263 \cdot 10^{-2}$	$0,7896 \cdot 10^{-2}$	29,3
1	$0,6055 \cdot 10^{-2}$	$0,5104 \cdot 10^{-2}$	54,3
2	$0,8738 \cdot 10^{-2}$	$0,2421 \cdot 10^{-2}$	78,3
3	$0,980 \cdot 10^{-2}$	$0,1359 \cdot 10^{-2}$	88
4	" "	" "	"

Diagramm 1 zeigt die Werte von $S_0 - x$ jeder Reaktion gegen die Zeit t aufgetragen.

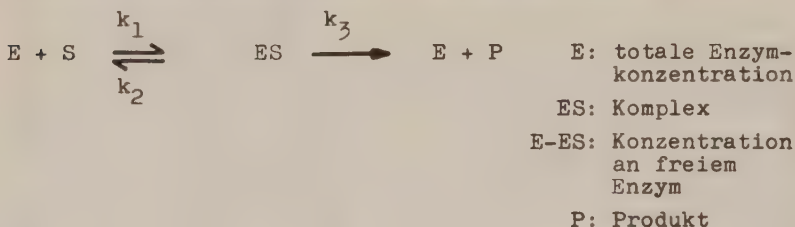


1.5 Kinetische Untersuchungen

1.5.1 Michaelis-Menten-Gleichung und Möglichkeiten zur Ermittlung von K_m und v_{max}

Aus den analytischen Daten des vorigen Kapitels können die Michaeliskonstante K_m und die Maximalgeschwindigkeit v_{max} , die Charakteristika des Enzyms darstellen, ermittelt werden. Die für eine Enzymreaktion geltenden Gesetzmäßigkeiten werden im folgenden dargestellt:

Die Grundlage aller kinetischen Betrachtungen bildet die Annahme eines Enzym-Substrat-Zwischenkomplexes (77-80):



Bildung von ES aus E und S:

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 (E - ES) (S)$$

Zerfall von ES:

$$- \frac{d(ES)}{dt} = k_2 (ES) + k_3 (ES)$$

für den stationären Zustand gilt:

Bildung von (ES) = Zerfall von (ES)

$$- \frac{d(ES)}{dt} = \frac{d(ES)}{dt}$$

$$k_1 (E - ES) (S) = k_2 (ES) + k_3 (ES) = (k_2 + k_3) (ES)$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{(E-ES) (S)}{(ES)} = K_m \quad \text{Michaelis-Konstante}$$

$$(ES) = \frac{(E)(S)}{K_m + (S)}$$

Geschwindigkeit $v \sim (ES)$

$$v = k_3 (ES) \quad v = k_3 \frac{(E)(S)}{K_m + (S)}$$

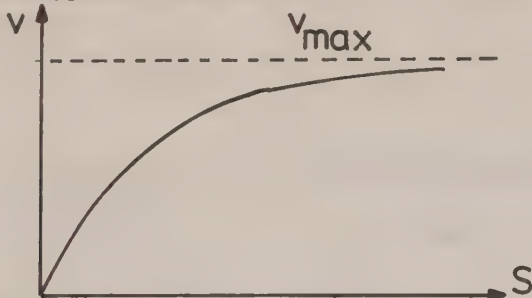
Bei hoher Substratkonzentration liegt alles Enzym als (ES) vor, die Reaktion läuft mit der Maximalgeschwindigkeit $v_{\max}$ ab.

$$v_{\max} = k_3 (E)$$

$$v = \frac{v_{\max} (S)}{K_m + (S)} \quad \text{Gleich. 1 Michaelis-Menten-Gleichung}$$

Ist $v = 1/2 v_{\max}$, so ergibt sich: $K_m = S$

Trägt man die Anfangsgeschwindigkeiten enzymatischer Reaktionen mit verschiedenen Substratkonzentrationen gegen die entsprechenden Substratkonzentrationen auf, so ergibt sich eine hyperbolische Kurve:



Eine Enzymreaktion, die mit der durch die Michaelis-Menten-Gleichung gegebenen Geschwindigkeit abläuft, ist gemischter 0. und 1. Ordnung. Die beobachtete Reaktionsordnung wird jedoch von der Substratkonzentration bestimmt; ist die Substratkonzentration sehr hoch, so verläuft die Enzymreaktion nach reiner 0. Ordnung (a), ist sie klein, so verläuft die Enzymreaktion nach reiner 1. Ordnung (b):

- a) Die Substratkonzentration ist sehr groß gegenüber K_m .
Dann vereinfacht sich Gleichung 1 zu:

$$v = v_{\max}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist maximal und unabhängig von (S), die Reaktion verläuft nach 0. Ordnung.

- b) Die Substratkonzentration ist sehr klein gegenüber K_m .
Gleichung 1 vereinfacht sich dann zu:

$$v = \frac{v_{\max}}{K_m} (S) \qquad v = k (S)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist von (S) abhängig, die Reaktion verläuft nach 1. Ordnung. k ist die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion 1. Ordnung.

Diese Gesetzmäßigkeiten lassen sich halbquantitativ ausdrücken:

von (S) = 0 bis (S) $\approx 10 K_m$

$$\frac{v}{v_{\max}} = 0 \text{ bis}$$

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{10}{11} = 0,91$$

} v wird durch E und (S) begrenzt

von (S) $\approx 10 K_m$ bis (S) $\approx \infty$

$$\frac{v}{v_{\max}} = 0,91$$

bis

$$\frac{v}{v_{\max}} = 1$$

} v wird durch E begrenzt, direkte Prop. zwischen v bzw. $v_{\max}$ u. E

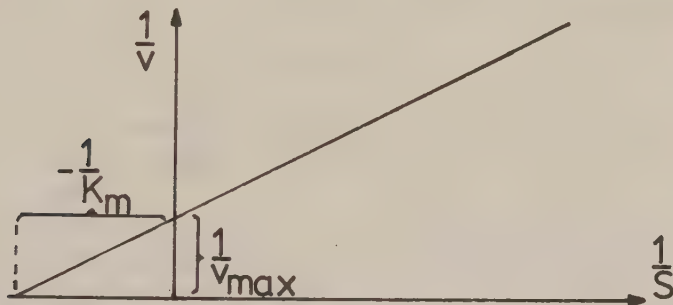
Ist K_m bekannt, so läßt sich der Substratkonzentrationsbereich angeben, bei dem die Reaktion mit maximaler Geschwindigkeit abläuft, also $S \approx 10 K_m$ (79).

Graphische Ermittlung von K_m und $v_{\max}$

Die meist benutzte Darstellung ist das Lineweaver-Burke-Diagramm (81). Es basiert auf der umgeformten Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Man geht so vor, daß man Reaktionen bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchführt, die Anfangsgeschwindigkeiten ermittelt und $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{S}$ aufträgt:



Die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung (82) erlaubt die Auswertung von Meßdaten einer einzigen Enzymreaktion:

$$v = - \frac{dS}{dt} = \frac{v_{\max} (S)}{K_m + (S)} = \frac{v_{\max}}{\frac{K_m}{S} + 1}$$

Nach Integration dieser Differentialgleichung ergibt sich:

$$K_m \ln \frac{S_0}{S_0 - x} + x = v_{\max} t \quad \text{Gleichung 2}$$

S_0 : Substratanfangskonzentration

x : Umsatz

t : Zeit

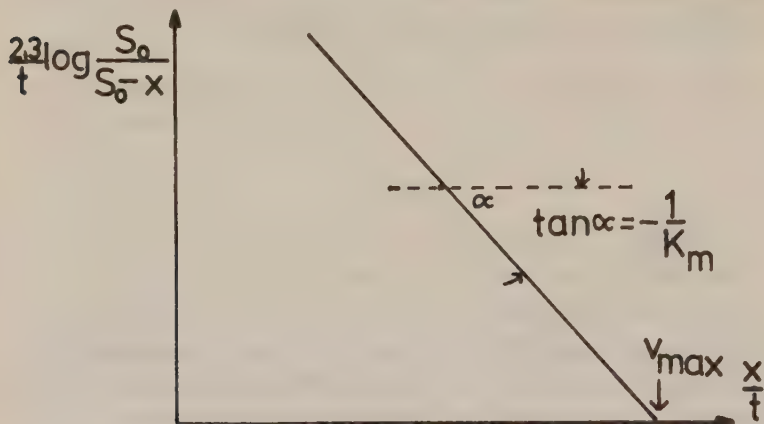
Gleichung 2 umgeformt ergibt:

$$-\frac{2,3}{t} \log \frac{S_0}{S_0 - x} = \frac{v_{\max}}{K_m} - \frac{1}{K_m} \frac{x}{t} \quad \text{Gleichung 3}$$

Trägt man auf der Ordinate eines Koordinatensystems die den Messungen entnommenen Werte von x und t in der

Form $\frac{2.3}{t} \log \frac{S_0}{S_0 - x}$, auf der Abszisse in der Form

$\frac{x}{t}$ auf, so ergibt sich eine Gerade (Darstellung nach Walker u. Schmidt):



Die Steigung der Geraden beträgt $-\frac{1}{K_m}$, ihr Schnittpunkt mit der Abszisse ist $v_{\max}$.

Damit sich die Gerade in dieser Form ergibt, müssen die Werte von $\frac{x}{t}$ mit zunehmender Zeit fallen, die in der logarithmischen Form dargestellten Werte mit zunehmender Zeit dagegen anwachsen.

Diese Art der graphischen Darstellung zur Ermittlung von K_m und $v_{\max}$ wurde in vorliegender Arbeit verwendet.

Auch mit Gleichung 3 (vorige Seite) läßt sich der Einfluß sehr hoher und sehr niedriger Substratkonzentrationen auf die Reaktionsordnung zeigen:

a) $S_0 \gg x$, $S_0 \gg K_m$

Der logarithmische Term der Gleichung 3 entfällt:

$$v_{\max} t = x \quad \text{Gleichung 3 a}$$

Der Umsatz ist der Zeit proportional und unabhängig von (S), die Reaktion verläuft nach 0. Ordnung.

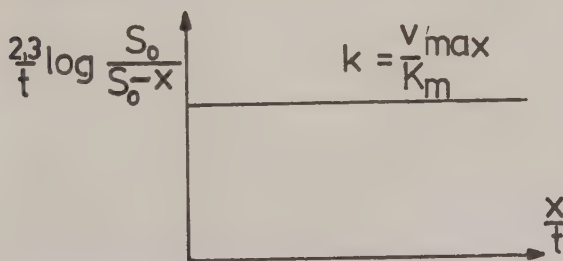
$$b) S_0 \ll K_m \quad x \ll K_m$$

Der Term, der x in linearer Form enthält, entfällt.

$$\frac{2,3}{t} \log \frac{S_0}{S_0 - x} = \frac{v_{\max}}{K_m} = k \quad \text{Gleichung 3 b}$$

Der verbliebene logarithmische Term der Gleichung 3 ist also identisch mit der Geschwindigkeitskonstanten k einer Reaktion 1. Ordnung. Nach dieser Reaktionsordnung läuft nun die enzymatische Reaktion ab.

Arbeitet man also mit niedriger Substratkonzentration, so daß die Enzymreaktion nach 1. Ordnung verläuft, so ist eine Bestimmung von K_m und $v_{\max}$ nach geschildertem graphischen Verfahren nicht möglich, Gleichung 3 reduziert sich auf den in Gleichung 3 b angegebenen Ausdruck. Das bedeutet aber, daß die Gerade des Walker-Schmidt-Diagrammes (S. 17) eine Parallele zur $\frac{x}{t}$ -Achse darstellt:



Im Falle der Reaktion 0. Ordnung ist zwar $v_{\max}$, aber nicht K_m bestimmbar (Gleichung 3 a).

Um beide Parameter, K_m und $v_{\max}$, bestimmen zu können, ist es notwendig, die Enzymreaktionen mit solchen Substratkonzentrationen durchzuführen, daß die Reaktionen nach ge-

mischer 0. und 1. Ordnung ablaufen.

1.5.2 Auswertung der fluorometrischen Meßdaten

x und t aus den fluorometrischen Messungen (Tabelle 1, Tabelle 2 auf S. 12) wurden in der logarithmischen- und $\frac{x}{t}$ - Form berechnet und in Tabelle 3 (Reaktion 1) und Tabelle 4 (Reaktion 2) aufgenommen (siehe S. 20).

Aus den Tabellen ist ersichtlich: Die $\frac{x}{t}$ Werte fallen mit zunehmender Zeit, wie zur graphischen Auswertung erforderlich ist, die logarithmischen Werte steigen dagegen mit zunehmender Zeit nicht an, sondern pendeln vielmehr um einen konstanten Wert. Das bedeutet nach vorigen Ausführungen, daß bei der gegebenen Substratkonzentration beide Reaktionen nach 1. Ordnung verlaufen und die logarithmischen Werte die Geschwindigkeitskonstanten darstellen. K_m und v_{max} sind nicht bestimmbar, einige andere Parameter der Enzymreaktionen lassen sich jedoch ermitteln:

Für die enzymatische Reaktion 1. Ordnung gilt:

$$v = k (S) (E) = k'(S)$$

$$2,3 \log \frac{S_0}{S_0 - x} = k't$$

Trägt man auf der Ordinate von Einfach-Logarithmenpapier die Werte $\frac{S_0}{S_0 - x}$, auf der Abszisse die Zeit t auf, so

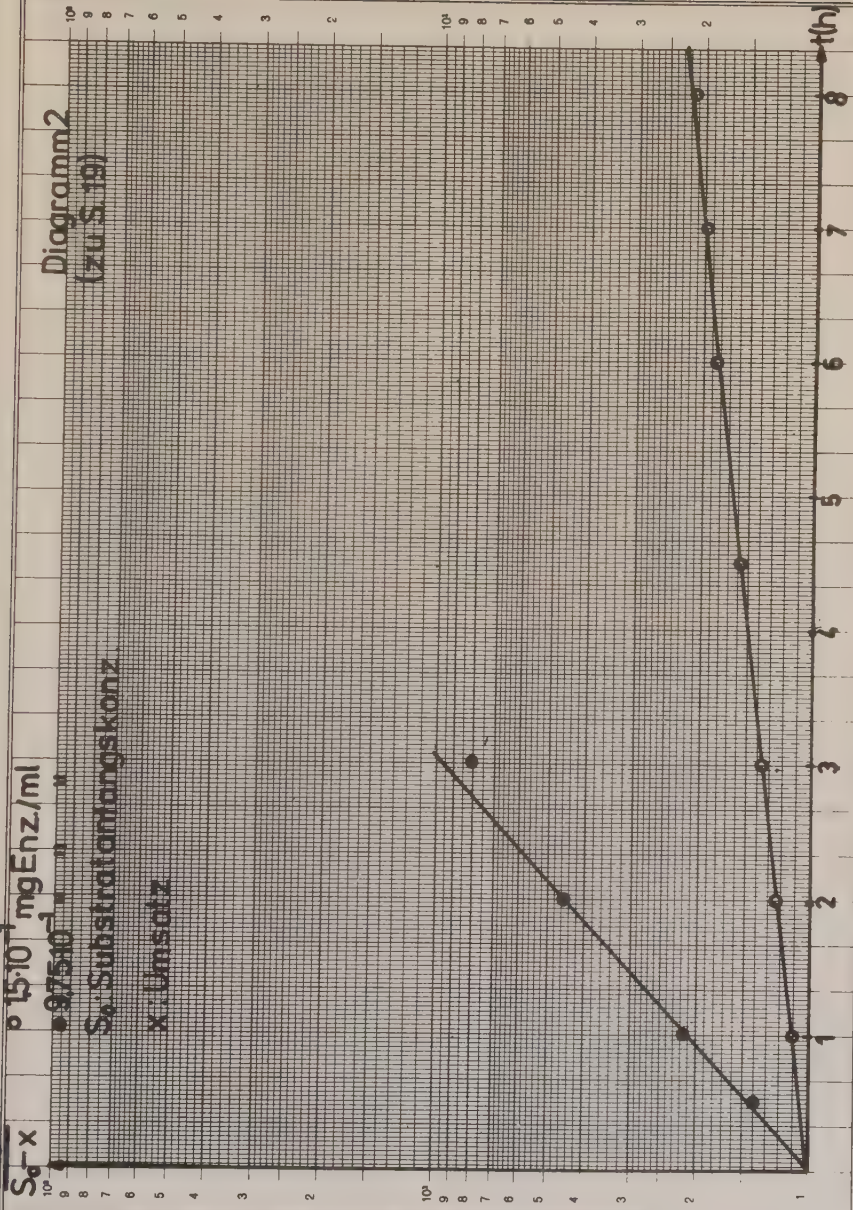
muß sich gemäß der letzten obigen Gleichung eine Gerade ergeben. Dies wird für die Reaktionen 1 und 2 gezeigt (Diagramm 2), wobei die Meßwerte aus Tabelle 3 und 4 benutzt wurden.

k_1 der Reaktion 1 ergibt sich als Mittelwert zu: $0,1034 \text{ h}^{-1}$
 k_2 der Reaktion 2 " " " " " : $0,733 \text{ h}^{-1}$

S_0 $S_0 - x$ $0.15 \cdot 10^{-1} \text{ mg Enz./ml}$ $0.975 \cdot 10^{-1} \text{ M}$ S_0 Substrat anfängskonz. x : Umsatz

Diagramm 2

(zu S. 19)



Teilung } 1 - 100, Einheit } 83.33 mm

Tabelle 3 (x , t , $S_0 - x$ aus Tab. 1 auf Seite 12 übernommen)

t (h)	$x(\text{Mol/l}) \cdot 10^{-2}$	$(S_0 - x)10^{-2}$	$\frac{2,3}{t} \log \frac{S_0}{S_t}$	$\frac{x}{t} \cdot 10^{-2}$
1	0,1135	1.0034	0,106	0,1135
2	0,218	0,8976	0,1128	0,1091
3	0,3036	0,8123	0,1053	0,1002
4,5	0,4145	0,7014	0,1029	0,0922
6	0,514	0,6019	0,1023	0,8059
7	0,5545	0,5614	0,098	0,0793
8	0,6003	0,5156	0,0964	0,075

Tabelle 4 (x , t , $S_0 - x$ aus Tab. 2 auf Seite 12 übernommen)

0,5	0,3263	0,7896	0,690	0,654
1	0,6055	0,5104	0,778	0,6055
2	0,8738	0,2421	0,763	0,436
3	0,980	0,1359	0,702	0,32622

S_0 : Substratanfangskonzentration

S_t : $S_0 - x$: Substratkonzentration zur Zeit t

x : Mol/l L-Phenylalanin (Umsatz)

Berechnungen von Enzymkonzentrationen aus den Geschwindigkeitskonstanten:

Die Erhöhung oder Erniedrigung einer Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung, die sich aus unter gleichen Bedingungen durchgeführten Reaktionen mit erhöhter, bzw. erniedrigter Enzymkonzentration ergibt, ist nur auf die Enzymkonzentration zurückzuführen.

Für die Geschwindigkeitskonstante k_1' der Reaktion 1 gilt:

$$k_1' = (E_1) \cdot k \quad E_1: \text{Enzymkonzentration der Reaktion 1}$$

Für die Geschwindigkeitskonstante k_2' der Reaktion 2 gilt:

$$k_2' = (E_2) \cdot k \quad E_2: \text{Enzymkonzentration der Reaktion 2}$$

Durch Kombination beider Gleichungen läßt sich die als unbekannt angenommene Konzentration E_2 berechnen:

$$(E_2) = \frac{k_2'}{k_1'} \quad (E_1)$$

E_1 der Reaktion 1 betrug 0,15 mg Enzym/ml Reaktionslösung. Unter Benutzung der obigen Beziehung ergibt sich dann die Enzymkonzentration E_2 der Reaktion 2 zu 1,06 mg/ml (verwendet wurden 0,975 mg/ml), wobei die auf Seite 19 angegebenen Werte von k_1' und k_2' benutzt wurden.

Halbwertszeit:

Für die Halbwertszeit τ d.h. die Zeit, bei der $x = S_t = \frac{S_0}{2}$ beträgt, gilt:

$$\tau = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k}$$

Reaktion 1: τ = 6 h 42 Min. Experiment: 7 h

Reaktion 2: τ = 56 Min. Experiment: 54 Min.

Die experimentellen Werte der Halbwertszeiten wurden aus den Abbaukurven (Diagramm 1) entnommen.

1.5.3 Quantitative Verfolgung der Enzymreaktionen mit Hilfe der optischen Drehung

1.5.3.1 Allgemeines

Zur Bestimmung von K_m und v_{max} ist nach den Ausführungen unter 1.5.1 eine höhere Substratkonzentration nötig. Für hohe Konzentrationen von enzymatisch entstandenem Phenylalanin läßt sich jedoch die Fluoreszenzmethode durch eine experimentell leichter zu bewältigende Methode, die Polarimetrie, ersetzen. Die Fluoreszenzmethode fand aber an geeigneter Stelle bei späteren Versuchen, wo kurzzeitige Enzymreaktionen, für die eine niedrige Substratkonzentration erforderlich ist, durchgeführt wurden, weiterhin Verwendung.

Der gemessene Drehwert α einer optisch aktiven Substanz ist ihrer Konzentration proportional:

$$\alpha = [\alpha] \cdot \frac{1 \text{ c}}{100} \quad \begin{array}{l} [\alpha], \text{ spez. Drehung} \\ 1 \text{ Küvettenlänge in dm} \\ c \text{ Konz. in g/100 ml} \end{array}$$

L-Phenylalanin und Acetyl-D-phenylalanin weisen beide eine spezifische Drehung mit negativem Vorzeichen auf. Die Drehwerte der enzymatischen Reaktionslösung setzen sich somit in jedem Moment additiv aus den Einzeldrehwerten von L-Phenylalanin und Acetyl-D-phenylalanin zusammen. Das Enzym selbst besaß in wäßriger Lösung bei den verwendeten Konzentrationen einen vernachlässigbaren Drehwert von $+0,008^\circ$.

Zur polarimetrischen Konzentrationsbestimmung ist der Enddrehwert der enzymatischen Reaktionslösung erforderlich. Mit seiner Hilfe (vergl. 8.1) ergibt sich für den Umsatz x zur Zeit t die Beziehung:

$$x = 0,05774 \alpha_t$$

Bei den Enzymreaktionen wurde eine Substratanfangskonzentration (S_0) von 0,193 Mol/l Acetyl-L-phenylalanin verwendet. Diese Lösung ist 17,3 x konzentrierter als die Reaktionslösung, die bei der fluorometrischen Methode benutzt wurde. Es entstehen bei 100 % igem Umsatz 0,193 Mol/l L-Phenylalanin; mit dieser Konzentration ist die Löslichkeitsgrenze des L-Phenylalanins in H_2O fast erreicht.

1.5.3.2 Abbaukurven, K_m und v_{max} aus Abbauversuch ohne Fremdpuﬀer

Eine Stammlösung von Acetyl-DL-phenylalanin mit der in 8.1 angegebenen Konzentration wurde hergestellt, das Acetyl-DL-phenylalanin lag als Na-Salz durch Zugabe einer äquimolaren Menge $NaHCO_3$ vor (pH 6,2). Die Lösung war außerdem 10^{-4} m an $CoCl_2$. Co-Ionen wirken in dieser Konzentration aktivierend auf das Enzym, wie durch Untersuchungen von Michi und Tsuda (83) an Acylasen festgestellt wurde. Alle weiteren Enzymreaktionen wurden in Gegenwart von $CoCl_2$ durchgeführt. Eine Enzymlösung mit einem Gehalt von 2 mg Enzym/ml wurde hergestellt. Auch diese Lösung war 10^{-4} m an $CoCl_2$. Vorversuche mit DC hatten ergeben, daß bei dieser Enzymkonzentration die Substratlösung in 8 h zu 50-60 % abgebaut wird. Die Reaktion längere Zeitdauer und bis zu höherem Umsatz durchzuführen, erwies sich als ungünstig, da dann Produkthemmung (vergl. 3.5) auftritt. Auch kann bei zu langer Reaktion das Enzym irreversible Schädigungen erleiden.

Gleiche Volumina beider Lösungen wurden zusammengegeben und bei $40^{\circ}C$ inkubiert. Ein Teil der Lösung wurde in die auf $40^{\circ}C$ geheizte Polarimeterküvette überführt, wo die Reaktion ohne Störungen weiter ablaufen konnte. Der pH der Lösung war nach beendeter Reaktion auf 6,8

gestiegen.

Die Meßwerte sowie die berechneten logarithmischen- und $\frac{x}{t}$ - Werte finden sich in Tabelle 5 auf Seite 25.

Aus der Tabelle läßt sich entnehmen: Die Werte von $\frac{x}{t}$ fallen mit fortlaufender Zeit, die logarithmischen Werte steigen mit fortlaufender Zeit kontinuierlich an. Dies bedeutet aber, daß die Reaktion nach der gewünschten gemischten 0. und 1. Ordnung verlief und die Gleichung 3 auf Seite 17 Gültigkeit hat.

Die logarithmischen Werte aus der Tabelle wurden gegen die $\frac{x}{t}$ - Werte aufgetragen (Diagramm 3 a). Es ergab sich eine Gerade, die sich aus dicht zusammenliegenden Punkten zusammensetzte. Ihre Steigung betrug $-\frac{1}{K_m}$, der Abszissenschnittpunkt ergab $v_{\max}$ (vergl. 1.5.1, S. 17). Es ergab sich:

$$K_m = 0,139 \text{ Mol/l}$$
$$v_{\max} = 3,58 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l h}^{-1}$$

Zur genaueren Auswertung wurden die logarithmischen- und $\frac{x}{t}$ - Werte in einen Kleincomputer eingegeben und die Regressionsgerade berechnet. Aus ihrer Steigung ist wiederum K_m bestimmbar, aus ihrem Schnittpunkt mit der $\frac{x}{t}$ - Achse $v_{\max}$:

$$K_m = 0,151 \text{ Mol/l}$$
$$v_{\max} = 3,66 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l h}^{-1}$$

Die Michaeliskonstante K_m ist ziemlich hoch. Das bedeutet, daß das Gleichgewicht $K_m (\text{ES}) = (E - \text{ES}) (S)$ (vergl. 1.5.1) auf die Seite des freien Enzyms verschoben ist; die Affinität des Enzyms zum Substrat ist gering.

Mit $10 K_m = 1,51 \text{ Mol/l}$ wäre also eine 1,5 m Lösung von Acetyl-L-phenylalanin nötig, um die Reaktion nach 0. Ordnung und mit Maximalgeschwindigkeit ablaufen zu lassen (vergl. 1.5.1).

Tabelle 5

Enzymabbau ohne Fremdpuﬀer

t (h)	$-\alpha_t$	x 10^{-2}	$\frac{x}{t}$ 10^{-2}	$\frac{2,3}{t} \log \frac{S_0}{S_t}$	% Abbau
2,5	0,827	4,78	1,91	0,1135	24,75
2,75	0,900	5,20	1,89	0,1141	27,0
3	0,980	5,66	1,886	0,1159	29,4
3,5	1,133	6,54	1,87	0,1180	33,9
3,75	1,207	6,96	1,855	0,1190	36,1
4	1,278	7,36	1,841	0,1200	38,2
4,25	1,347	7,76	1,828	0,1209	40,3
4,5	1,418	8,16	1,815	0,1223	42,5
5	1,547	8,92	1,784	0,1238	46,3
5,25	1,610	9,30	1,77	0,1250	48,2
5,5	1,672	9,65	1,755	0,1258	50,0
5,75	1,737	10,02	1,741	0,1269	52,0
6	1,791	10,34	1,721	0,1278	53,6
6,25	1,846	10,65	1,705	0,1281	55,3
6,5	1,899	10,96	1,685	0,1289	56,9
7	2,002	11,53	1,65	0,1299	60,0

S_0 (Substratanfangskonzentration): 0,193 Mol/l Acetyl-L-phenylalanin

S_t : $S_0 - x$

x: Mol/l L-Phenylalanin (Umsatz)

α_t : Drehwert zur Zeit t

Enzymmenge: 1 mg/ml Reaktionslösung

$$\frac{2.3}{t} \log \frac{S_0}{S_0 - x}$$

K_m - Ermittlung

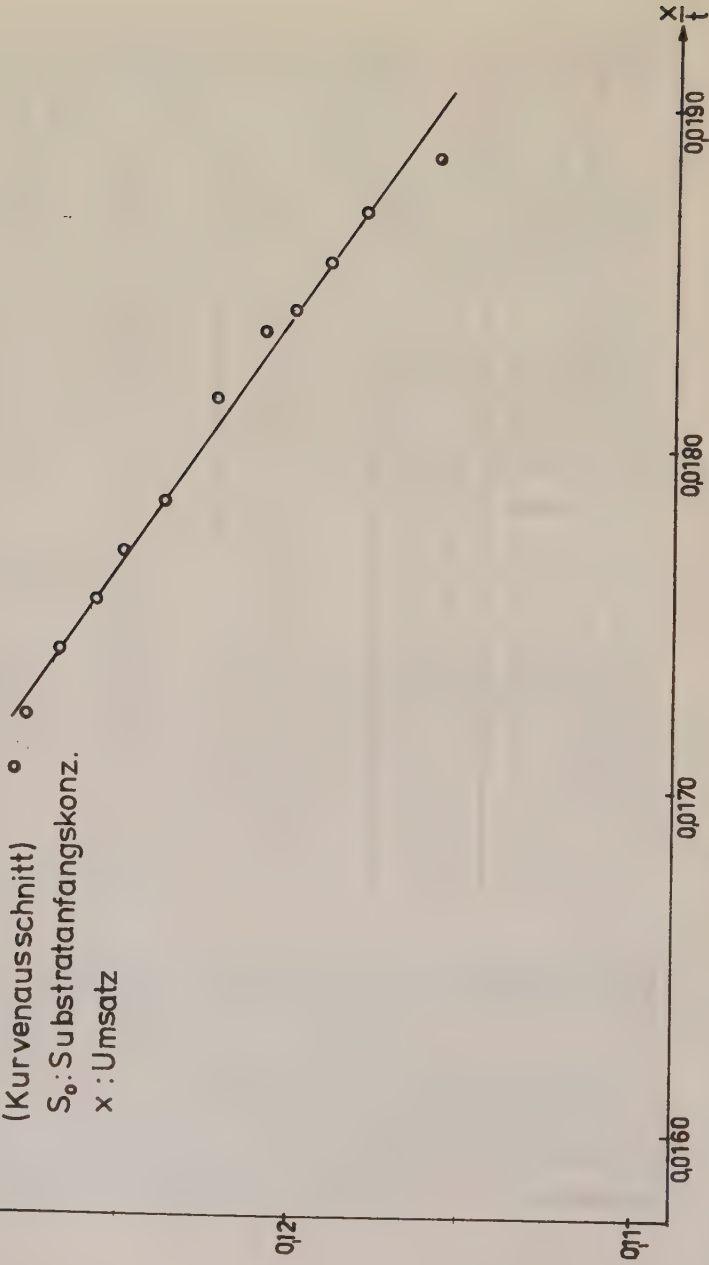
kein Fremdpufer

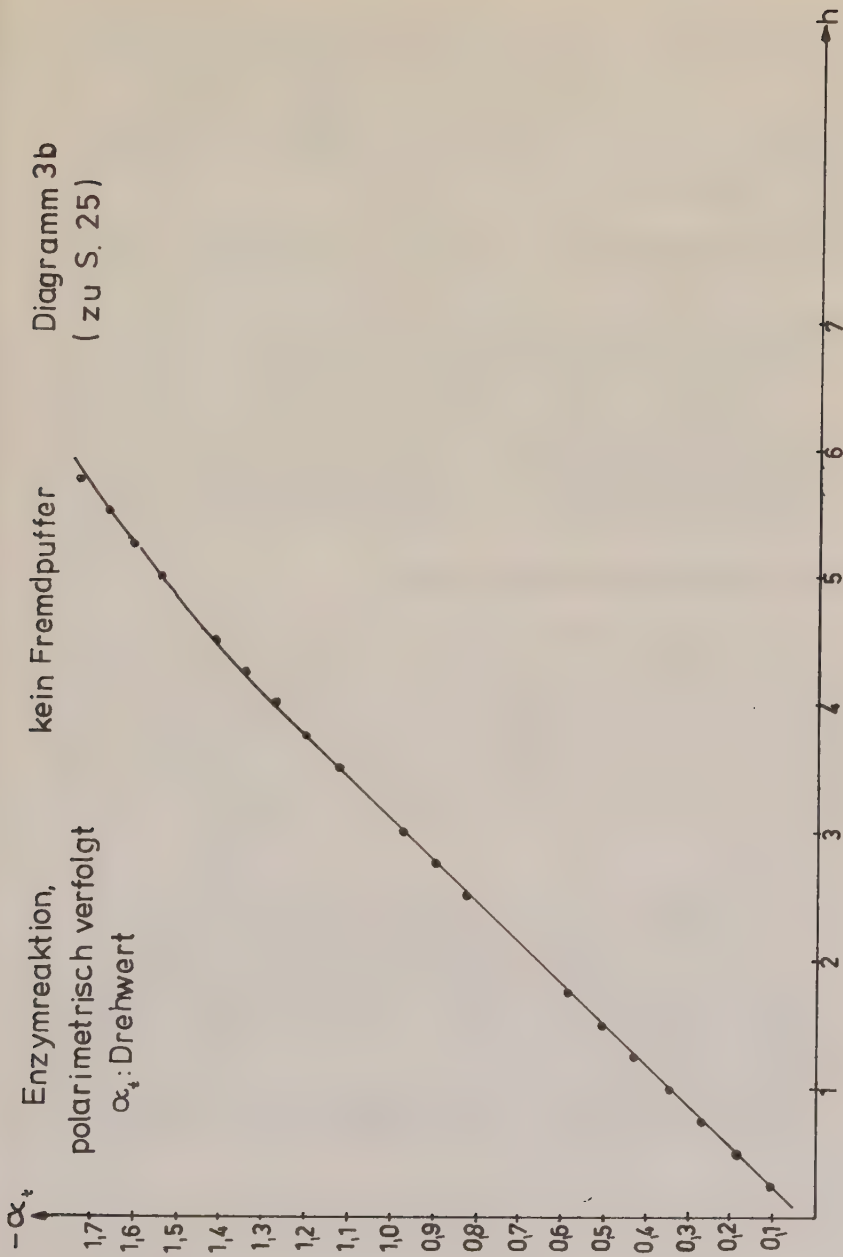
Diagramm 3a
(zu S. 25)

(Kurvenausschnitt)

S_0 : Substratanfangskonz.

x : Umsatz





Diese Konzentration ist wegen der Löslichkeitsgrenze des entstehenden L-Phenylalanins nicht erreichbar.

Die zu den Fluoreszenzmessungen verwendete Substratkonzentration von $1,115 \cdot 10^{-2}$ Mol/l mußte die enzymatische Reaktion tatsächlich in den Bereich der 1. Ordnung bringen.

Die Halbwertszeit τ für $x = \frac{S_0}{2}$ berechnet sich nach Gleichung 3 (S. 16) zu:

$$\tau = -\frac{K_m}{v_{\max}} \left[\frac{S_0}{2 K_m} + 2,3 \log 2 \right]$$

K_m und $v_{\max}$ aus den Computerdaten, in diese Gleichung eingesetzt, ergibt:

$$\tau = 5 \text{ h } 29 \text{ Min.}$$

$$\text{Experiment: } \tau = 5 \text{ h } 30 \text{ Min.}$$

1.5.3.3 Ermittlung des pH-Optimums

Das pH-Optimum ist der pH-Wert, bei dem die enzymkatalysierte Reaktion am schnellsten verläuft. Die pH-Abhängigkeit wird der Dissoziation von Ionengruppen des Enzyms zugeschrieben, die an der Enzymkatalyse und/oder Substratbindung teilnehmen (84). Das pH-Optimum wird ebenfalls zur Charakterisierung eines Enzyms herangezogen.

Umsetzungen bei pH 5,7; 6,2; 6,55; 6,8; 7,1; 7,45; 8 und 8,9 wurden durchgeführt. Für den pH-Bereich von 5,7 - 7,45 wurde ein $0,3 \text{ m Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ - Puffer (Sörensen-Puffer) verwendet, für pH 8 ein $0,05 \text{ m}$, für pH 8,9 ein $0,5 \text{ m}$ Tris-Puffer. Die Pufferlösungen waren 10^{-4} m an CoCl_2 .

Zuerst wurde geprüft, ob sich der Enddrehwert bei verschiedenen pH-Werten verändert (Messungen bei 40° C):

ungepuffert, pH 6,2: - 3,342°
 Sörensen-Puffer pH 6,2: - 3,339°
 " " pH 6,5: - 3,340°
 Tris-Puffer pH 8,05:- 3,335°

Die Werte zeigten im gewählten pH-Bereich Konstanz.

Die Stammlösungen mit der üblichen Substratkonzentration (vergl. 8.1) wurden durch Lösen des Na-Salzes von Acetyl-DL-phenylalanin in der Pufferlösung mit dem jeweiligen pH hergestellt, ebenso Enzymlösungen gleicher Konzentration und verschiedenem pH. Jede Stammlösung wurde mit der Enzymlösung, die den zugehörigen pH besaß, versetzt und jede Reaktion die gleiche Zeit bei 40° C andauern gelassen. Dann wurden die Drehwerte jeder Reaktionslösung mit auf 40° C geheizter Küvette gemessen.

pH	α_D nach 4 h
5,7	0,522°
6,2	1,004°
6,55	1,192°
6,8	1,16 °
7,1	1,067°
7,45	0,949°
8,05	0,653°
8,9	0,258°

In Diagramm 4 wurden die Drehwerte gegen den pH aufgetragen und ergaben eine glockenförmige Kurve. Die Kurve ist verzerrt, da der Umsatz nicht nur von der Zeit, was bei einer Reaktion 0. Ordnung der Fall wäre, sondern auch von (S) abhängt. Es läßt sich jedoch gut erkennen, daß das pH-Optimum bei 6,55 liegt.

pH-Profil

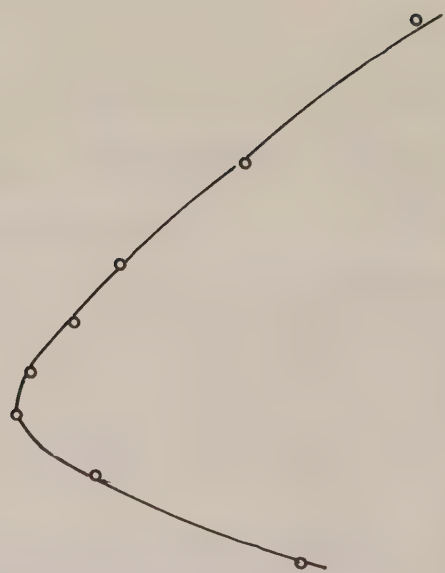
Diagramm 4

(zu S. 27)

$-\alpha_t$

α_t : Drehwert

1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1



pH

5

6

7

8

9

1.5.3.4 K_m bei pH 6,5

K_m -Werte wurden nun bei einem definierten pH bestimmt, zuerst bei dem pH-Optimum von 6,5. Verwendet wurde ein 0,3 m Sörensen-Puffer. Darin wurde das Acetyl-DL-phenylalanin (als Na-Salz) gelöst, ebenso das Enzym, und die Reaktion analog 1.5.3.2 durchgeführt.

Der Umsatz pro Zeiteinheit war etwas niedriger als bei der Reaktion ohne Fremdpuﬀer, was möglicherweise auf den Einfluß der Fremdionen (Ionenstärke) zurückzuführen ist. Die berechneten $\frac{x}{t}$ - Werte fielen mit zunehmender Zeit, die logarithmischen Werte nahmen zu, jedoch in sehr geringem Maße; einige aufeinanderfolgende Werte blieben auch konstant. Die zugehörige Regressionsgerade und ihre Steigung wurde im Computer berechnet. Es ergab sich:

$$K_m = 0,767 \text{ Mol/l} \quad (v_{\max} \text{ wurde nicht berechnet})$$

Der Versuch wurde wiederholt und wiederum K_m mit dem Computer bestimmt:

$$K_m = 0,488 \text{ Mol/l}$$

$$\text{Mittelwert der beiden } K_m\text{-Werte : } 0,627 \text{ Mol/l}$$

Eigentümlicherweise ist die Michaeliskonstante beim pH-Optimum (6,5) wesentlich höher als bei der Reaktion ohne Fremdpuﬀer (pH 6,2 - 6,8), bei der sich K_m zu 0,151 Mol/l ergeben hatte. Wahrscheinlich hängen die drei Konstanten der Gleichung

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \quad \text{in komplizierter Weise von pH und Ionenstärke ab und lassen den Zähler der Gleichung und damit } K_m \text{ größer erscheinen.}$$

1.5.3.5 Abbaukurven, K_m und v_{max} bei pH 6,2

Die Enzymreaktion wurde bei pH 6,2, wieder unter Verwendung eines 0,3 m Sörensen-Puffers, analog den vorigen Versuchen durchgeführt. Die logarithmischen- und $\frac{x}{t}$ - Werte wurden in Tabelle 6 aufgenommen (S. 30). Wiederum fallen die $\frac{x}{t}$ - Werte mit zunehmender Zeit, die logarithmischen Werte steigen dagegen an. In Diagramm 5 a ist die sich daraus ergebende Gerade gezeigt.

$$\begin{aligned}K_m &= 0,120 \text{ Mol/l} \\v_{max} &= 2,53 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l h}^{-1}\end{aligned}$$

Wiederum wurde die Regressionsgerade im Computer berechnet und K_m und v_{max} bestimmt:

$$\begin{aligned}K_m &= 0,121 \text{ Mol/l} \\v_{max} &= 2,62 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l h}^{-1}\end{aligned}$$

Dieser K_m -Wert stimmt mit dem K_m -Wert der Reaktion ohne Fremdpuﬀer ($K_m = 0,151 \text{ Mol/l}$) praktisch überein.

Halbwertszeit τ der Reaktion bei pH 6,2:

$$\tau = 6 \text{ h } 54 \text{ Min.} \quad \text{Experiment: } 7 \text{ h}$$

Diagramm 3 b zeigt die Drehwerte der Reaktion ohne Fremdpuﬀer (vergl. 1.5.3.2) gegen die Zeit aufgetragen, Diagramm 5 b die der Reaktion bei pH 6,2.

1.5.3.6 Abbauversuche bei pH 5,7; 8,05 und 8,9

Für den Abbau bei pH 5,7 wurde wieder ein 0,3 m Sörensen-Puffer, für pH 8,05 und 8,9 ein 0,05 m bzw. 0,5 m Tris-Puffer benutzt und die logarithmischen- und $\frac{x}{t}$ - Werte aus den Meßdaten berechnet. Bei der Reaktion bei pH 5,7 zeigte sich:

Die logarithmischen Werte stiegen mit fortlaufender Zeit

Tabelle 6

Enzymabbau bei pH 6,2

t (h)	$-\alpha_t$	$x \cdot 10^{-2}$	$\frac{x}{t} \cdot 10^{-2}$	$\frac{2,3}{t} \log \frac{S_0}{S_t}$	% Abbau
2,25	0,583	3,365	1,498	0,0847	17,5
2,5	0,648	3,74	1,497	0,0861	19,4
2,75	0,712	4,11	1,493	0,0867	21,3
3,25	0,828	4,78	1,47	0,0876	24,8
3,5	0,888	5,125	1,463	0,0881	26,7
3,75	0,948	5,47	1,459	0,0886	28,4
4	1,004	5,80	1,449	0,0893	30,0
4,25	1,063	6,14	1,444	0,0901	31,8
4,5	1,121	6,48	1,440	0,0909	33,6
4,75	1,176	6,79	1,429	0,0912	35,2
5	1,238	7,14	1,429	0,0924	37,0
5,25	1,292	7,45	1,420	0,0929	38,6
5,5	1,348	7,775	1,412	0,0935	40,3
5,75	1,402	8,09	1,408	0,0942	41,9
6	1,453	8,39	1,399	0,0949	43,5
6,25	1,502	8,66	1,386	0,0952	44,9
6,5	1,552	8,96	1,379	0,0958	46,5
6,75	1,602	9,25	1,370	0,0965	48,0
7	1,653	9,54	1,363	0,0974	49,4
7,25	1,702	9,82	1,355	0,0980	50,9
7,5	1,744	10,02	1,339	0,0984	52,0
7,75	1,790	10,33	1,332	0,0989	53,5
8	1,834	10,59	1,324	0,0993	54,9
8,25	1,878	10,84	1,315	0,0998	56,2
8,5	1,921	11,09	1,303	0,1004	57,4

S_0 : 0,193 Mol/l Acetyl-L-phenylalanin; x: Mol/l L-Phenylalanin
 S_t : $S_0 - x$; α_t : Drehwert zur Zeit t (Umsatz)
 Enzymmenge: 1 mg/ml Reaktionslösung

$$2.3 \log \frac{S_0}{S_0 - x}$$

K_m -Ermittlung

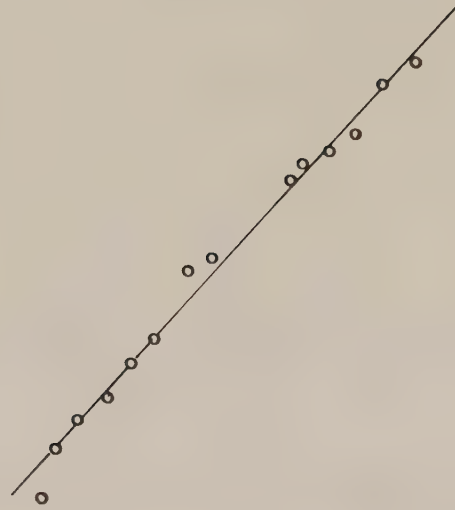
(Kurvenausschnitt)

S_0 : Substratanfangskonz.

x : Umsatz

pH 6,2

Diagramm 5a
(zu S. 30)



$\frac{x}{t}$

0.015

0.014

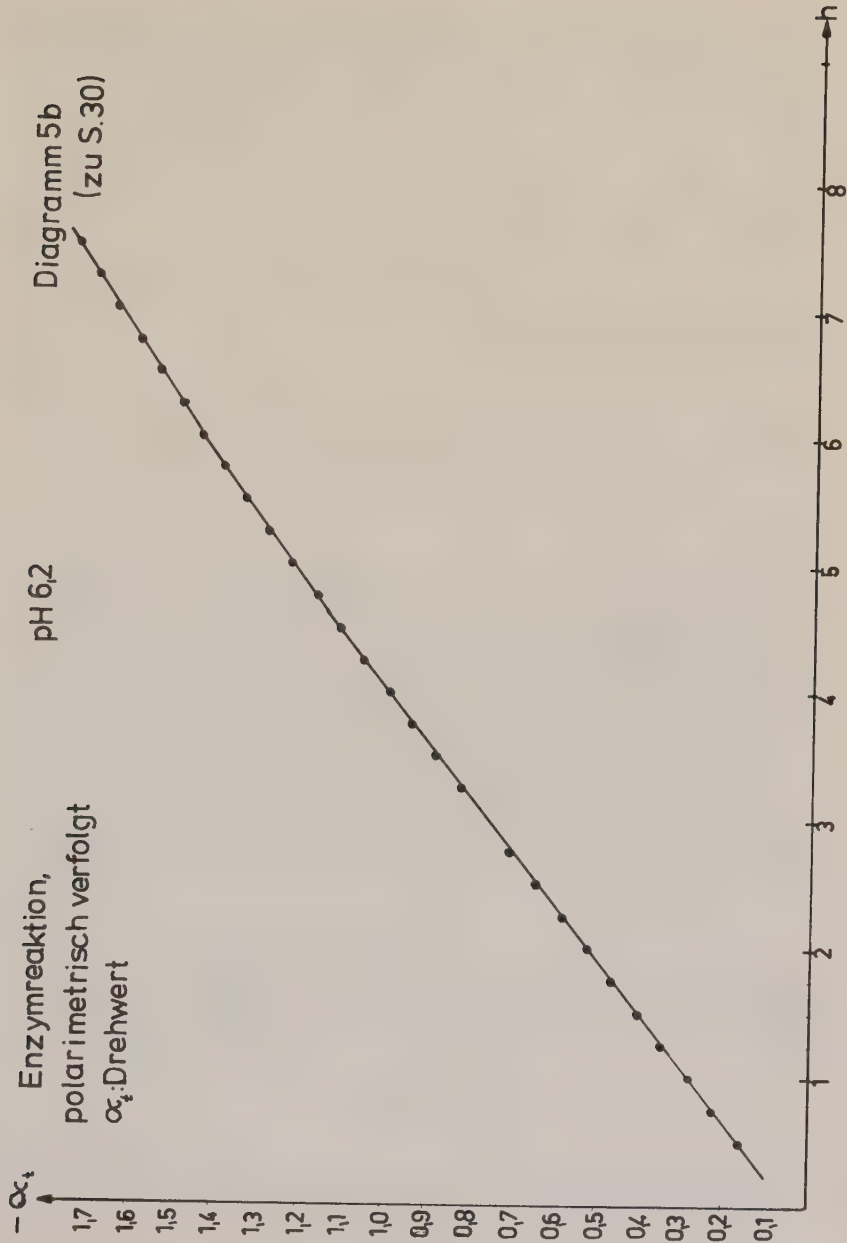
0.013

0.012

0.08

0.09

0.1



an, desgleichen aber auch die $\frac{x}{t}$ - Werte, die eigentlich abnehmen müßten. Eine Bestimmung der gesuchten Parameter nach dem üblichen Verfahren ist somit nicht möglich.

Bei den Reaktionen bei pH 8,05 und 8,9 zeigte sich:

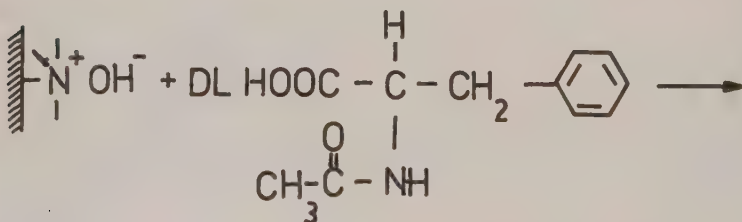
Die $\frac{x}{t}$ - Werte fielen zwar mit zunehmender Zeit, die logarithmischen Werte jedoch auch. Auch hier ist eine Bestimmung der beiden Parameter nicht möglich.

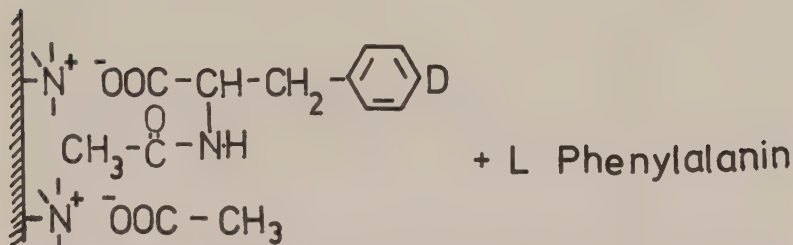
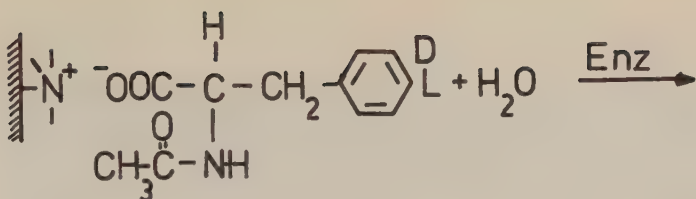
K_m und v_{max} lassen sich also nur aus Reaktionen ermitteln, die bei einem pH in der Nähe des Optimums von 6,5 durchgeführt werden.

1.5.3.7 Denaturiertes Enzym und optische Drehung

Über das optische Verhalten des Enzyms nach Denaturierung gab ein mit ursprünglich anderem Ziel geplanter Versuch Aufschluß.

Na-Acetat wirkt bei höheren Konzentrationen als Inhibitor, wie spätere Versuche zeigten (vergl. 3.5). Deshalb sollte Acetyl-DL-phenylalanin in Säureform auf einen basischen Ionenaustauscher (OH-Form) gebunden und dort von dem Enzym in wäßriger Lösung gespalten werden. Acetyl-D-phenylalanin und die Acetationen werden auf dem Ionenaustauscher festgehalten, während L-Phenylalanin als Zwitterion in die wäßrige Phase geht. Auf diese Weise können die Acetationen nicht mehr hemmend wirken:





Die Umsetzungen wurden durchgeführt und Proben zur Drehwerts-messung entnommen. Es zeigte sich jedoch, daß sich die wäßrige Phase nach etwa 2 h Reaktionsdauer zu trüben begann. Die im Polarimeter untersuchten Proben zeigten einen sich langsam in positiver (!) Richtung verändernden Drehwert; auf dem DC ließ sich entstandenes L-Phenylalanin in geringen Mengen nachweisen. Offenbar war das Enzym im Laufe der Zeit denaturiert worden. Eine Probe des Enzyms wurde daher durch Erhitzen denaturiert und ebenfalls im Polarimeter beobachtet; es wies das gleiche Verhalten wie das Enzym aus der Reaktion auf. Denaturierend wirkte wahrscheinlich auf das Enzym der längere Kontakt mit dem hydrophoben Grundgerüst (Polystyrol) des Harzes, das sich wie ein hydrophobes Lösungsmittel verhält. Auch elektrostatische Einflüsse können sich auf das Enzym ungünstig ausgewirkt haben. Bemerkenswert ist die positive optische Drehung sowohl des aktiven wie auch des denaturierten Enzyms. Die meisten Eiweiße weisen einen negativen Drehwert auf, der bei der Denaturierung anwächst (85).

1.5.4 Diskussion

Über die beschriebene Methode der K_m - und $v_{\max}$ -Ermittlung

soll kurz diskutiert werden.

Wie man aus den Meßwerten zur K_m - Bestimmung (vergl. Tabelle 5 und 6) sieht, ist die Zunahme der logarithmischen Werte, womit sich die Gerade der Steigung $-\frac{1}{K_m}$ darstellen ließ, sehr klein. Somit ist auch der Unterschied zwischen einer Reaktion 1. Ordnung, bei der - wie gezeigt wurde - eine K_m - Bestimmung nicht möglich ist, und einer Reaktion gemischter Ordnung bei der verwendeten Substratkonzentration klein. Die auf Halblogarithmenpapier gegen t aufgetragenen $\frac{S_0}{S_0 - x}$ - Werte der Messungen bei pH 6,2 (Diagramm 5 c) und ohne Fremd-puffer (Diagramm 3 c) ergeben deshalb auch Geraden, wie wenn diese Reaktionen nach reiner 1. Ordnung abgelaufen wären.

Mit einem sehr genauen Meßverfahren wie der Polarimetrie (Ablesungen auf 3 Stellen nach dem Komma möglich) lassen sich die Unterschiede zwischen gemischter 0. und 1. Ordnung und reiner 1. Ordnung noch erfassen. Außerdem konnten die Reaktionen ohne Störung in der Küvette ablaufen gelassen werden. Reaktionsstörungen irgend welcher Art lassen die zur K_m - Bestimmung nötigen Wertedifferenzen leicht verschwinden. Diese Schwierigkeiten traten bei den späteren Versuchen mit dem fixierten Enzym auf.

$$\frac{S_0 - x}{S_0}$$

kein Fremdpuffer

Diagramm 3c
(zu S. 33)

S_0 : Substrat-
konz.

x : Umsatz

$vt(h)$

Teilung } 1 - 100, Units
Logar. Division } 83.33 mm

$$\frac{S_0}{S_0 - x}$$

S_0 : Substratanz-
konzentration

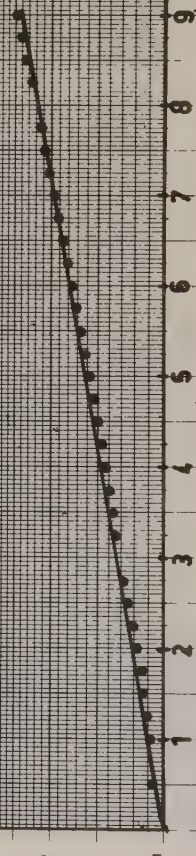
x: Umsatz

pH 6,2

Diagramm 5c
(zu S. 33)

10¹⁰
9
8
7
6
5
4
3
2

10¹⁰
9
8
7
6
5
4
3
2



Teilung } Einheit }
Division } 1-100, Unité } 83,33 mm

2. Trägersysteme zur kovalenten Bindung des Enzyms

2.1 Hydrophobe Matrix auf Polystyrolbasis

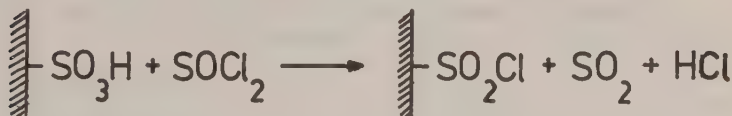
In diesem Kapitel werden aktivierte Träger beschrieben, auf die das Enzym kovalent gebunden werden sollte. Als Matrix dienten zunächst Polystyrolharze in Perlform. Dieses Trägermaterial hat vor allem den Vorteil, nicht von Mikroorganismen angegriffen zu werden, was bei Polysaccharidträgern eintreten kann. Das Polystyrol-Grundgerüst ist hydrophob, d.h. in Wasser tritt praktisch keine Quellung auf. Verschiedene Autoren haben dieses Material zur Enzymfixierung benutzt (vergl. Einleitung F).

2.1.1 Darstellungsmöglichkeiten für Harze mit Sulfochloridgruppen

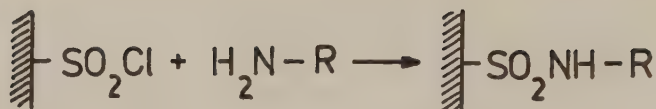
2.1.1.1 Behandlung eines sulfonsauren Ionenaustauschers mit SOCl_2 oder PCl_5

a) mit SOCl_2

Die Sulfogruppen eines sauren Ionenaustauschers (Dowex 50 X) sollen durch Behandlung mit SOCl_2 in die Sulfochloridgruppen überführt werden. Allerdings können dabei auch Anhydride entstehen (86):



Die Sulfochloridgruppen sind die Reaktivkomponenten der Matrix und reagieren mit RNH_2 unter Ausbildung einer Sulfonamidbindung:

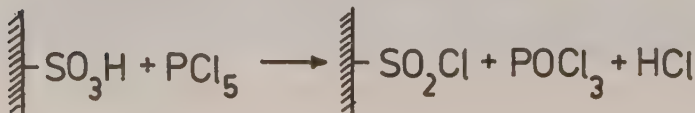


Der Ionenaustauscher besaß die durch Titration ermittelte Anzahl von 5,6 mÄq. SO_3H -Gruppen/g trockenes Harz. Nach der Umsetzung mit SOCl_2 ergab sich ein Gehalt an Sulfochloridgruppen von 2,04 mÄq./g Harz. Hierbei war das Harz 24 h lang mit SOCl_2 unter Rückfluß umgesetzt worden. Bei einer Reaktionsdauer von 2,5 Tagen wurde ein Harz mit dem Gehalt von 2,5 mÄq./g Sulfochloridgruppen erhalten. Der Gehalt an Sulfochloridgruppen wurde durch Cl-Bestimmung nach dem in 2.1.2.3 angegebenen Analysenverfahren ermittelt.

Der Gehalt an noch unumgesetzten Sulfogruppen wirkt sich möglicherweise günstig aus, da er den hydrophoben Charakter des Polystyrolharzes etwas mindert; auch können durch elektrostatische Wechselwirkungen die Enzymmoleküle an die Matrix herangeführt und festgehalten werden. Dadurch können sie schneller mit den Sulfochloridgruppen reagieren. Andererseits sind die elektrostatischen Effekte nicht kontrollierbar und können das Enzym auch ungünstig beeinflussen. In den folgenden Experimenten wurde daher versucht, die Sulfogruppen vollständig umzuwandeln.

b) mit PCl_5

Durch Umsetzung eines Dowex 50 WX 2-Harzes mit PCl_5 gelang eine fast vollständige Überführung der Sulfogruppen in die Sulfochloridgruppen (87):

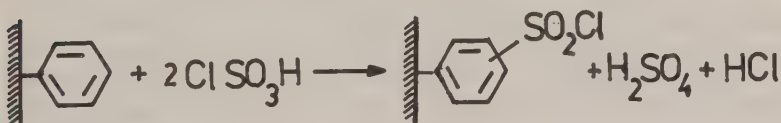


Das gebildete POCl_3 wirkt ebenfalls chlorierend.

Gehalt an SO_3H (nach Cl -Abspaltung): 5,31 mÄq./g
 " " SO_2Cl : 4,77 " "

2.1.1.2 Behandlung von Polystyrol/DVB mit Chlorsulfonsäure und $\text{ClSO}_3\text{H}/\text{SOCl}_2$

Besitzt ein Träger eine zu hohe Anzahl reaktiver Gruppen, so kann das Enzym an zu vielen Stellen kovalent gebunden werden, was zu einer Veränderung der Eiweißkonfiguration und Starrheit des Enzymmoleküls führen kann (41). Aktivitätsverminderung ist dann die Folge. Deshalb wurde versucht, den Sulfochloridgehalt der Harze herabzusetzen. Bei geringerer Sulfochlorierung des Ionenaustauschers würden aber wieder die nicht erwünschten Sulfogruppen vorhanden sein. Mit Chlorsulfonsäure ist es jedoch möglich, Sulfochloridgruppen in der erforderlichen Anzahl direkt in Polystyrol einzuführen (88):



Die Behandlung eines Copolymers aus Styrol und 2 % Divinylbenzol in CH_2Cl_2 als Quellmittel mit Chlorsulfonsäure ergab ein Harz mit wieder zu hohem SO_2Cl - bzw. SO_3H -Gehalt:

SO_2Cl : 3,97 mÄq./g
 SO_3H : 4,21 " " (nach Cl -Abspaltung)

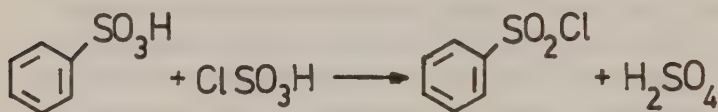
Ein höher vernetztes Polystyrolharz (Bio-Beads S 48, 8 % DVB) wurde mit geringerer Menge Reagens bei verkürzter Reaktionszeit behandelt:

SO_2Cl : 0,615 mÄq./g
 SO_3H : 4,25 " " (nach Cl -Abspaltung)

Der Gehalt an SO_2Cl wäre hier in der gewünschten Größenordnung, doch wies das Harz einen sehr hohen SO_3H -Gehalt auf. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Reaktion von Chlorsulfonsäure mit Aromaten in 2 Stufen verläuft, von denen die 1. sulfonierend wirkt (88):



Bei dieser Stufe ist die Harzreaktion offenbar vorwiegend stehen geblieben. In der 2. Stufe wirkt das 2. Mol Chlorsulfonsäure chlorierend auf die Sulfogruppe:



Serienversuche von Umsetzungen verschiedener Mengen Chlorsulfonsäure mit den gleichen Mengen des zu 8 % vernetzten Harzes im Quellungsmittel (CH_2Cl_2) wurden durchgeführt:

mäq. $\text{ClSO}_3\text{H}/\text{g Harz}$	mäq. $\text{SO}_2\text{Cl}/\text{g}$	mäq. $\text{SO}_3\text{H}/\text{g}$ (nach Verseifung)
0,3	0,22	0,195
0,9	0,35	0,354
2,7	0,5	1,16
8,1	1,56	3,9

Ein 4 % DVB vernetztes Harz wurde in CH_2Cl_2 mit Chlorsulfonsäure (0,9 mäq./g) versetzt, dann mit SOCl_2 nachbehandelt. Dabei ließ sich fast vollständige Sulfochlorierung erzielen:

SO_2Cl : 0,85 mäq./g

SO_3H : 1,07 " " (nach Cl-Abspaltung)

Analog wurde ein 1 % DVB vernetztes Harz behandelt:

SO_2Cl : 0,963 mÄq./g

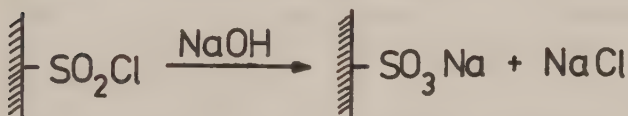
SO_3H : 0,95 " " (nach Cl-Abspaltung)

Diese beiden Harze wurden bei der späteren Enzymumsetzung benutzt.

2.1.1.3 Analytik

Ermittlung der Anzahl Sulfochloridgruppen:

Von einer gewaschenen, getrockneten und eingewogenen Harzprobe wird Chlorid durch Behandlung mit wäßriger NaOH und Dioxan als Quellmittel abgespalten:



Die Lösung wird in einen Meßkolben überführt, aufgefüllt, mit HNO_3 angesäuert und der Gehalt an Chlorid durch Titration mit AgNO_3 ermittelt.

Ermittlung der Anzahl Sulfogruppen:

Nach Abspaltung von Chlorid besitzt die Harzprobe die Eigenschaften eines Ionenaustauschers. Durch Behandlung mit HCl auf einer geeigneten kleinen Säule wird die Säureform hergestellt:



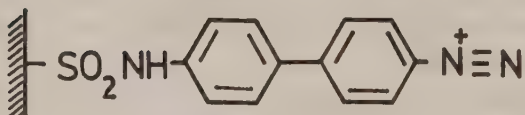
Nach dem Neutralwaschen wird NaCl-Lösung durch die Säule gegeben:



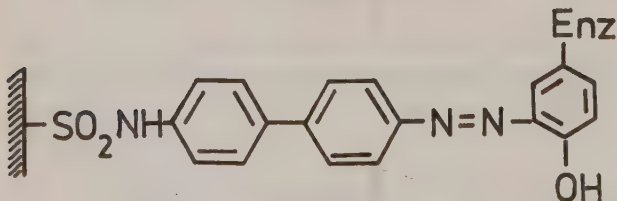
Der HCl-Gehalt der Lösung wird durch Titration ermittelt und ist mit der Anzahl Sulfogruppen des Harzes identisch. Die Bestimmung läßt sich durch Regenerieren des Ionenaustauschers beliebig wiederholen.

2.1.2 Harze mit diazotiertem Benzidin oder Diaminodiphenylmethan als Reaktivgruppe

Als Reaktivgruppe der Matrix wird die Diazogruppe benutzt (vergl. Einleitung F). Harze mit aromatischen Aminogruppen wurden durch Umsetzung von Sulfochloridharzen mit Benzidin gewonnen. Die Aminogruppen wurden in die Diazogruppen überführt:



Die Diazogruppen lassen sich auf die Tyrosin-, Histidin- oder Tryptophanreste des Enzymproteins kuppeln:



Das Benzidin tritt als langes Molekül gleichzeitig als "spacer" in Funktion (52,90). Durch einen spacer wird die Aufrechterhaltung der Raumstruktur eines Proteins besser gewährleistet als durch ein kurzes, unbewegliches Molekül, das das gebundene Enzymmolekül sehr dicht an die Matrix heranführt.

Das zu a) 4 % DVB vernetzte Sulfochloridharz (0,85 mÄq. $\text{SO}_2\text{Cl/g}$) sowie das zu b) 1 % DVB vernetzte Sulfochloridharz (0,963 mÄq. $\text{SO}_2\text{Cl/g}$) wurde mit großem Überschuß an Benzidin in CH_2Cl_2 umgesetzt. Durch den Überschuß kann vermieden werden, daß nach der Reaktion eines Moleküls Benzidin eine noch vorhandene Sulfochloridgruppe mit der freien Aminogruppe des Benzidins unter Ausbildung eines Ringes reagiert.

Aus der N-Analyse der gewaschenen Harzproben ergab sich ein Benzidingehalt von:

0,885 mÄq./g bei a)

0,995 " " " b)

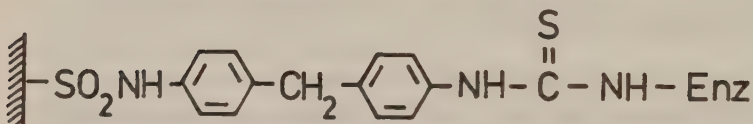
Diazotiert wurden die Harze nach dem üblichen Diazotierungsverfahren unter Verwendung eines großen Überschusses an NaNO_2 .

Um einen noch besseren spacer zu erhalten, wurde das 1 % DVB vernetzte Sulfochloridharz b) mit 4,4' Diaminodiphenylmethan (größere Kettenlänge als Benzidin, außerdem Drehbarkeit der Benzolringe um die CH_2 -Gruppe) nach oben geschildertem Verfahren umgesetzt. Der Gehalt des Harzes an dieser Aminokomponente betrug 0,896 mÄq./g. Das Harz wurde ebenfalls diazotiert.

2.1.3 Harze mit Isothiocyanatgruppierung

Isothiocyanatgruppen wurden durch Behandlung des obigen Diphenylaminomethanharzes mit Thiophosgen in CCl_4 erhalten:

Diese Verbindung kann mit dem Enzym unter Bildung eines Thioharnstoffderivates reagieren:



2.1.4 Umsetzung der Harze mit Enzym und Diskussion

Die aktivierten Harze wurden nach folgendem Standardverfahren, das wegen seiner allgemeinen Bedeutung hier beschrieben werden soll, mit Enzym umgesetzt:

Das jeweilige gewaschene Harz (300 mg) wurde in 1 ml 0,1 n NaHCO_3 -Lösung suspendiert (Präparatenglas), dann wurden je 50 mg Enzym unter Kühlung zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C unter langsamem Rühren (Magnetrührer) durchgeführt. Dann wurden die Harze durch Waschen mit 0,1 n NaHCO_3 -Lösung von nichtgebundenem und adsorbiertem Enzym befreit und die Enzymreaktionen mit 2 ml Substratlösung ($S_0 = 1,116 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Acetyl-L-phenylalanin) bei pH 8 und 40°C durchgeführt. Der Abbau wurde auf DC verfolgt, auf denen Vergleichskonzentrationen von L-Phenylalanin mit aufgetragen waren, um eine Abschätzung der evtl. fixierten Enzymmenge zu ermöglichen. Auch die Aktivität des vom jeweiligen Harz ausgewaschenen, nicht fixierten Enzyms in der Waschlösung wurde qualitativ geprüft; sie war bei allen Umsetzungen erhalten geblieben.

Resultat: Es war keine Freisetzung von Phenylalanin nach Umsetzung der Harze mit Substratlösung zu beobachten.

Untersuchungen wurden durchgeführt, ob die Matrix das entstehende Phenylalanin adsorbiert; dies war nicht der Fall. Ein hinzugekommener Gehalt an N, der vom Enzymprotein herrühren würde, ließ sich auf den Harzen nicht nachweisen. Das bedeutete, daß kein Enzym fixiert war.

Für die Nichtbindung des Enzyms auf den Harzen ist mit größter Wahrscheinlichkeit die Hydrophobie der Polystyrolmatrix verantwortlich, die sogar zu Denaturierung führen kann (vergl. 1.5.3.7). Da das Enzym hydrophilen Charakter hat, zeigt es wenig Tendenzen, in die Kanäle des Polystyrolkorns, in denen der Hauptteil der Reaktivgruppen sitzt, zu diffundieren. Außerdem ist der Querschnitt dieser Kanäle sehr klein, da das Korn in H_2O praktisch nicht quillt und die Kanäle nicht geweitet werden. Das hochmolekulare Enzymprotein, das eine etwa kugelförmige Gestalt besitzt, kann dann nur von den auf der Oberfläche sitzenden Reaktivgruppen gebunden werden.

Manecke (55,91) berichtet von Versuchen an einer Reihe von Polystyrolderivaten, die sich mit Proteinen jedoch wenig oder gar nicht umsetzen ließen. Grubhofer und Schleith benutzten diazotiertes Polystyrol (36) sowie säurechloridhaltige Ionenaustauscher (57), um Enzyme zu binden, beschreiben diese Harze aber nicht näher. Untersuchungen von Brandenberger (31) lassen vermuten, daß bei diesen Harzen die Enzyme nur adsorptiv an die Polystyrolmatrix gebunden wurden. Er selbst stellt ein Polyisocyanatstyrol her (31), das Eiweiße kovalent gebunden haben soll, macht jedoch keine quantitativen Angaben. Manecke (55,91) untersuchte diese Trägerart, gibt jedoch an, daß nur geringe Mengen an Protein aus wäßriger Lösung aufgenommen wurden. Als Erklärung dafür weist er ebenfalls auf die Hydrophobie des Trägers hin(91). Auch in vielen neueren Arbeiten wird auf die Hydrophilie sowie Porösität des Trägers als für die Enzymfixierung erforderliche Eigenschaften hingewiesen (10,25,52).

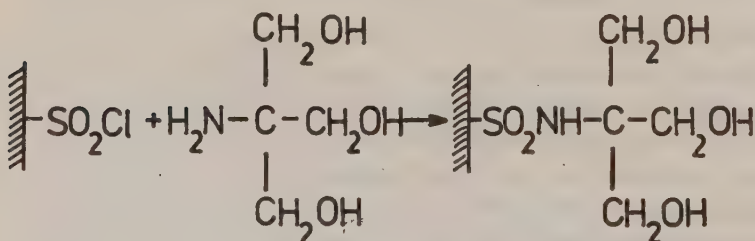
In den weiteren Experimenten wurde versucht, der Polystyrolmatrix durch Einführen von Hydroxi- oder Äthergruppen hydrophilen Charakter zu verleihen.

2.2 Hydrophile Matrix auf Polystyrolbasis

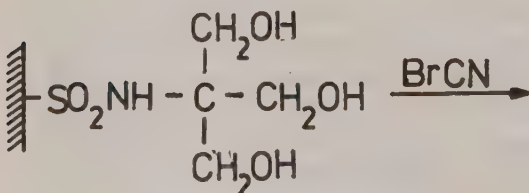
2.2.1 Darstellungsmöglichkeiten für Trisharze

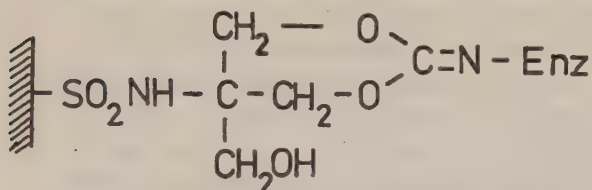
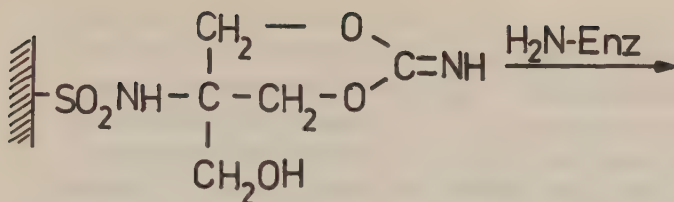
2.2.1.1 Behandlung von Sulfochloridharzen mit Tris

Tris-hydroxiäthyl-amino-methan, abgekürzt Tris, soll durch Reaktion mit einem Sulfochloridharz in die Polystyrolmatrix eingeführt werden und durch die OH-Gruppen ihre Hydrophobie herabsetzen:



Das Trisharz kann dann durch Reaktion mit BrCN aktiviert werden. Auf den Mechanismus der Aktivierung wird in 2.3 näher eingegangen:





Da möglichst viele Mole Tris in das Harz eingeführt werden sollten, um eine hohe Anzahl an OH-Gruppen zu erhalten, wurde ein Harz mit hohem Sulfochloridgehalt verwendet. Ein Ionenaustauscher (Dowex 50 W-X 2; 5,31 mÄq. $\text{SO}_3\text{H/g}$) wurde mit PCl_5 umgesetzt, das Produkt enthielt 4,5 mÄq. $\text{SO}_2\text{Cl/g}$.

Die Umsetzung mit Tris wurde in einem H_2O -Dioxan (2 : 1)-Gemisch bei 70°C durchgeführt, wobei das Dioxan als Quellmittel fungierte. Das Produkt enthielt nach der N-Analyse 2,95 mÄq. Tris/g Harz. Es wurde mit BrCN in wäßriger alkalischer Lösung nach dem für die Sephadex-Aktivierung angewendeten Verfahren (vergl. 2.3) umgesetzt. Von einer Probe wurde wiederum der N-Gehalt bestimmt und ergab 2,74 mÄq./g; offenbar hatte kein Umsatz mit BrCN stattgefunden. Die Aktivierung wurde deshalb in einem H_2O /Dioxan-Gemisch 1 : 1 durchgeführt. Das Produkt besaß danach einen N-Gehalt von 4,2 mÄq./g, also einen Mehrgehalt von 1,2 mÄq./g gegenüber dem Ausgangsharz. Der Einfluß der besseren Quellung wird hier ersichtlich.

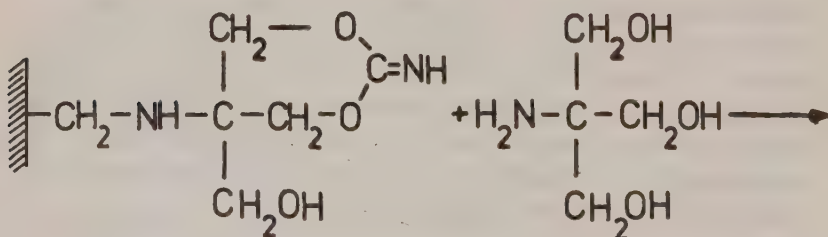
2.2.1.2 Behandlung von Chlormethyl-Polystyrol mit Tris

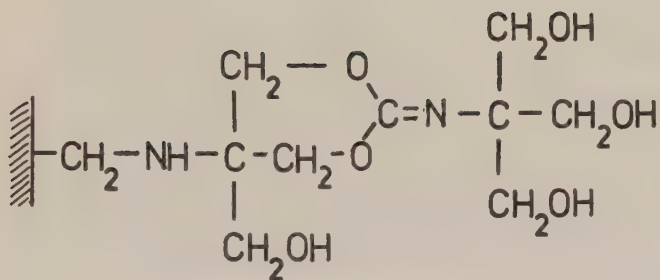
Die nicht mit Tris umgesetzten Sulfochloridgruppen des

im vorigen Kapitel beschriebenen Harzes können während der basischen Umsetzung mit BrCN oder auch während des späteren Enzymumsatzes zu den nicht erwünschten Sulfo-
gruppen verseift werden. Deshalb wurde ein chlormethy-
liertes Polystyrolharz, das bei Merrifield-Synthesen
Verwendung fand (Dr. Fankhauser) und 3,5 mÄq. Cl/g ent-
hielt, mit Tris umgesetzt. Eine Verseifung nicht umgesetzt-
ter -CH₂Cl-Gruppen ergibt hier -CH₂OH-Gruppen. Die
Umsetzung mit Tris wurde in reinem Dioxan bei 100° C
durchgeführt; die N-Bestimmung ergab einen Gehalt von
2,06 mÄq. Tris/g Harz. Die Umsetzung mit BrCN wurde
wieder in einem H₂O/Dioxan-Gemisch 1 : 1 durchgeführt,
das Produkt besaß einen N-Gehalt von 3,06 mÄq./g. Eine
Reaktion mit BrCN hatte somit stattgefunden; es gelang
aber nicht, Enzym auf diesen Träger zu fixieren.

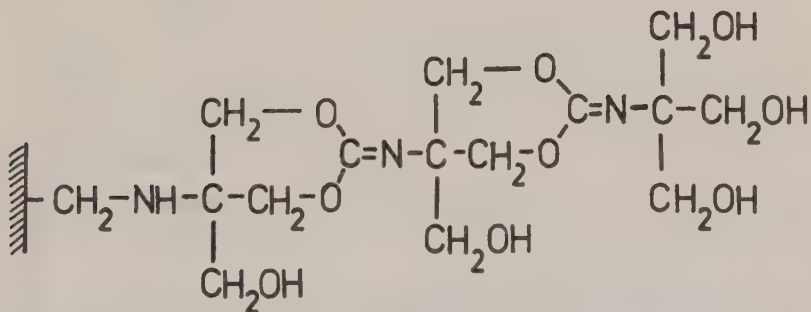
2.2.1.3 BrCN-Umsetzung und Tris-Behandlung von Trisharzen

Tris-Behandlung erschien als ein Verfahren, das die Hydro-
philie eines Trisharzes durch Einführen weiterer OH-Grup-
pen erhöhen sollte. Ein Trisharz wurde erst mit BrCN
und dann mit Tris umgesetzt, in der Hoffnung, folgende
Reaktion zu erzwingen:





Nochmalige BrCN-Tris-Behandlung sollte dann folgendes Produkt ergeben:



Mehrfache Wiederholung dieser Umsetzungen ließe einen hydrophilen "Mantel" um das Polystyrolkorn entstehen.

Das in 2.2.1.2 hergestellte Trisharz wurde in 5 Malen mit insgesamt 5 mMol Tris und 6 mMol BrCN abwechselnd behandelt, die letzte BrCN-Behandlung sollte zur Enzymfixierung dienen. Die N-Analyse ergab aber einen Wert von 3,1 mÄq./g, der mit dem N-Gehalt des BrCN umgesetzten Ausgangsharzes (vergl. 2.2.1.2) identisch ist (3,06 mÄq./g).

Offensichtlich hatte Tris unter den durch die BrCN-Umsetzung vorgegebenen Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, rel. kurze Reaktionsdauer) nicht reagiert.

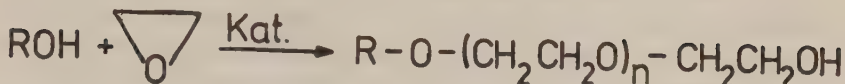
2.2.1.4 Versuche zur Enzymfixierung an BrCN umgesetzten Trisharzen

Die mit BrCN behandelten Harze wurden mit Enzym nach dem in 2.1.4 beschriebenen Standardverfahren umgesetzt. Die Umsetzungen wurden nicht nur in Wasser, sondern auch in H₂O/Dioxan-Gemischen 2 : 1, in denen das Enzym unveränderte Aktivität aufwies, durchgeführt. Das Dioxan sollte zur Erhöhung der Quellung dienen. Die Harzreaktion mit Substratlösung setzte jedoch kein Phenylalanin frei, auch der N-Gehalt der Harze war nach Enzymumsatz unverändert. Es war somit kein Enzym fixiert worden, die Hydrophilie der modifizierten Polystyrolmatrix ist offenbar immer noch zu klein. Auch wird durch die BrCN-Reaktion, vorausgesetzt, daß sie stattfinden würde, die Zahl der freien OH-Gruppen vermindert.

2.2.2 Polyäthylenglykol-Polystyrol-Harze: Allgemeines und Darstellungsmöglichkeiten

Läßt man Äthylenoxid in großen Mengen auf wenig Alkohol in Gegenwart basischer Katalysatoren einwirken, so ent-

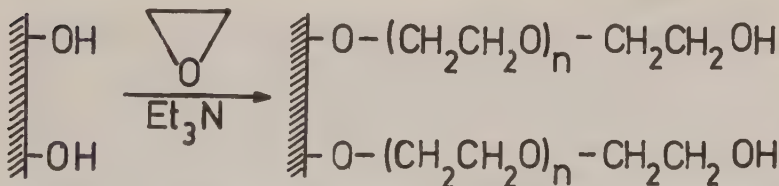
stehen Polyäthylenglykoläther (92):



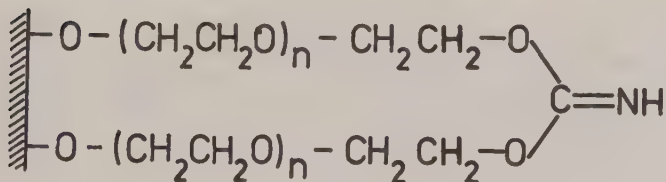
Diese Produkte sind bei nicht zu hohem Molekulargewicht infolge der endständigen OH-Gruppe und der Solvatisierung der Äthersauerstoffatome sehr hydrophil. Deshalb wurde versucht, in eine OH-Gruppen-haltige Polystyrolmatrix Polyäthylenglykoläther-Gruppen einzuführen.

2.2.2.1 Verwendung von Triäthylamin als Katalysator

Als OH-haltige Polystyrolmatrix wurde ein zum Alkohol verseiftes chlormethyliertes Polystyrolharz mit 1,8 mÄq.OH/g benutzt. Als basischer Katalysator diente Triäthylamin:



Es wurde erwartet, daß sich die endständigen OH-Gruppen mit BrCN umsetzen lassen würden:



Die Umsetzungen wurden in Dioxan als Quellmittel und 100 fachem Überschuß an Äthylenoxid, bezogen auf die benzyllischen OH-Gruppen, bei 80° C durchgeführt. Als Nebenprodukt fiel ein braunes Öl, vermutlich ein Polyäthylenglykol, an, das bei der Waschung des Harzes jedoch entfernt werden konnte.

Eine Probe des Harzes wurde in H₂O gequollen, dann das überstehende H₂O durch Zentrifugieren in einem Spezialfrittengefäß (Dr. Fankhauser) entfernt und der Wassergehalt des Harzes bestimmt. Dieser Wassergehalt ist ein Maß für die Quellung und somit die Hydrophilie des Harzes. Er betrug nur 6,5 % (vergl. das Produkt des folgenden Abschnittes), die Hydrophilie des Harzes war also nicht wesentlich gestiegen. Der Sauerstoffgehalt des getrockneten Harzes betrug 12,8 % = 8 mVal O/g (aus C, H-Bestimmung berechnet). Eine gewisse Addition von Äthylenoxid war somit geglückt.

Die mittlere Polyäthylenglykol-Kettenlänge berechnet sich wie folgt:

Umgesetzt wurden A g Hydroximethylharz mit y₀ Milliäquivalent Haftstellen pro g Harz (y₀ = 1,8).

Bestimmungsmethode: Kettenverlängerung um n - CH₂CH₂O-Einheiten bewirkt:

- 1.) Gewichtszunahme um n y₀ ΔG; ΔG = 44 mg/mVal (Gewicht einer - CH₂CH₂O - Einheit)
- 2.) Erhöhung des O-Gehaltes um n y₀ mVal O/g eingesetztes Harz

Ausgangsbasis: 1 g Hydroximethylharz

Neues Gewicht des Polyäthylenglykol-Polystyrol-Harzes:

$$1 + n \Delta G y_0$$

Neuer absoluter O-Gehalt: y₀ + n y₀ mVal

Neuer relativer O-Gehalt: $\frac{y_0 + n y_0}{1 + n \Delta G y_0} = x_m = 8 \text{ mVal/g}$

Löst man die letzte Gleichung nach n auf, so ergibt sich die Anzahl Kettenglieder des Harzes zu:

$$n = \frac{x_m - y_0}{y_0 (1 - x_m \Delta G)}$$

Aus dieser Gleichung bestimmte Anzahl Kettenglieder des Harzes:

$$n = \frac{8 - 1,8}{1,8 (1 - 0,352)} = 5,3$$

Für die Gewichtszunahme G_m pro g Ausgangsharz gilt:

$$G_m = y_0 n \Delta G$$

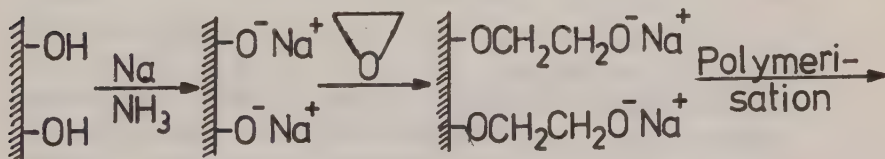
Die Gewichtszunahme des Harzes berechnet sich dann zu:

$$G_m = 1,8 \cdot 5,3 \cdot 0,044 = 0,42 \text{ g}$$

Es wurden noch mehrere Versuche mit Variationen der Reaktionstemperatur und -dauer durchgeführt, eine Kettenverlängerung ließ sich jedoch mit Triäthylamin als Katalysator nicht erzielen.

2.2.2.2 Verwendung von Na in flüssigem NH_3 und Eigenschaften des Polyäthylenoxid-Polystyrol-Harzes

Die OH-Gruppen des Harzes wurden durch Behandlung mit Na in flüssigem NH_3 in die Alkoholatanionen überführt. Dadurch ist deren Konzentration erheblich gesteigert:



Nach Abdampfen des NH_3 (Feuchtigkeitsausschluß) wurde das Harz in absolutem Dioxan mit Äthylenoxid umgesetzt. Das Produkt zeigte erhebliche Volumenvergrößerung und enthielt nur wenig Öl als Nebenprodukt.

Die Quellung des gewaschenen Harzes in H_2O ließ sich im Mikroskop gut beobachten: Die Harzkörner waren fast durchscheinend, während die Körner des Ausgangsharzes in H_2O undurchsichtig schwarz erschienen. Die durch die Quellung hervorgerufene Volumenvergrößerung des Polyäthylenglykolharzes gegenüber dem Ausgangsharz war beträchtlich. Ähnliches Quellungsverhalten zeigte das Produkt auch in Dioxan. Es wies eine erhebliche Anzahl Bruchstücke auf, mehrere Harzkörner besaßen Sprünge. Dies deutet auf Unverträglichkeit zwischen hydrophilem und hydrophobem Harzanteil hin.

Der H_2O -Gehalt einer Harzprobe nach dem in 2.2.2.1 beschriebenen Quellungsversuch betrug 52,5 %.

Der aus der C, H-Analyse berechnete O-Gehalt betrug 19,5 mVal/g. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden 3 weitere Polyäthylenglykolharze hergestellt. Ihr O-Gehalt betrug 20,3; 20,2 und 19 mVal/g; der Mittelwert aller 4 Bestimmungen ergibt 19,7 mVal O/g Harz = x_m . Daraus berechnet sich nach den Gleichungen des vorigen Kapitels die Anzahl der $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ Glieder zu 69, die Gewichtszunahme pro g Ausgangsharz ergibt sich zu 5,5g. Gefunden wurde eine Gewichtszunahme von 5,2 g/l g Harz als Mittelwert aus den 4 Umsetzungen.

Eine von Bruchstücken befreite Harzprobe wurde mit BrCN umgesetzt, der N-Gehalt war jedoch gering (0,24 mÄq./g). Um die Reaktionsfreudigkeit der OH-Gruppen des Polyäthylenglykolharzes für die BrCN-Reaktion zu erhöhen, wurde dieses ebenfalls mit Na in flüssigem NH_3 behandelt, dann mit BrCN umgesetzt. Der N-Gehalt dieses Harzes erhöhte sich auf 0,735 mÄq./g.

2.2.2.3 Umsetzung mit BrCN + Enzym und Diskussion

Die mit BrCN behandelten Harze wurden nach dem in 2.1.4 beschriebenen Verfahren mit Enzym umgesetzt und ihre enzymatische Aktivität durch Substratreaktion geprüft. Es war keine Bildung von Phenylalanin festzustellen, auch die N-Analyse der Harze nach dem Enzymumsatz ergab keine Zunahme des N-Gehaltes.

Trotz hydrophiler Polystyrolmatrix gelang die Fixierung von Enzym nicht. Der geringe N-Gehalt des hydrophilen Polyäthylenglykolharzes nach der BrCN-Umsetzung weist darauf hin, daß das Harz nur sehr wenig freie OH-Gruppen besitzt. Der Großteil der OH-Gruppen wurde möglicherweise durch Ringschlüsse in Äthergruppen umgewandelt.

Um den Gehalt an OH-Gruppen zu ermitteln, wurde eine gewogene Harzprobe 2 h lang bei 60° C mit in Dioxan gelöstem Bernsteinsäureanhydrid behandelt. Besäße das Harz OH-Gruppen, so würden diese mit dem Bernsteinsäureanhydrid reagieren. Nach der Reaktion besäße das Harz COOH-Gruppen und hätte die Eigenschaften eines sauren Ionenaustauschers. Der Gehalt an COOH-Gruppen wäre mit der Anzahl OH-Gruppen identisch.

Nach Waschung des Harzes wurde versucht, dieses mit NaOH zu titrieren. Es ergab sich jedoch kein Verbrauch von NaOH. Das bedeutet aber, daß das Harz keine OH-Gruppen besaß.

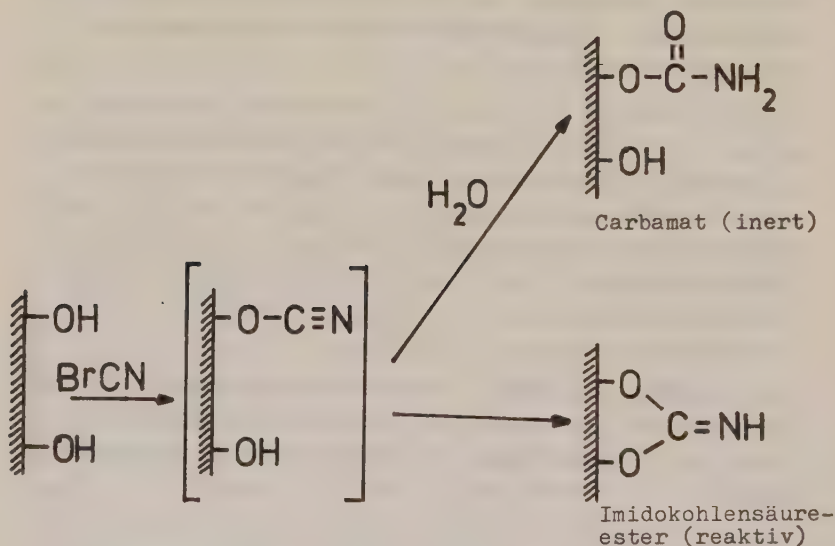
2.3 Hydrophile Matrix auf vorvernetzter Polysaccharidbasis: Sephadex als Trägermaterial

2.3.1 Aktivierung von Sephadex mit BrCN

Sephadex (quervernetztes Dextran), auch Agarose und

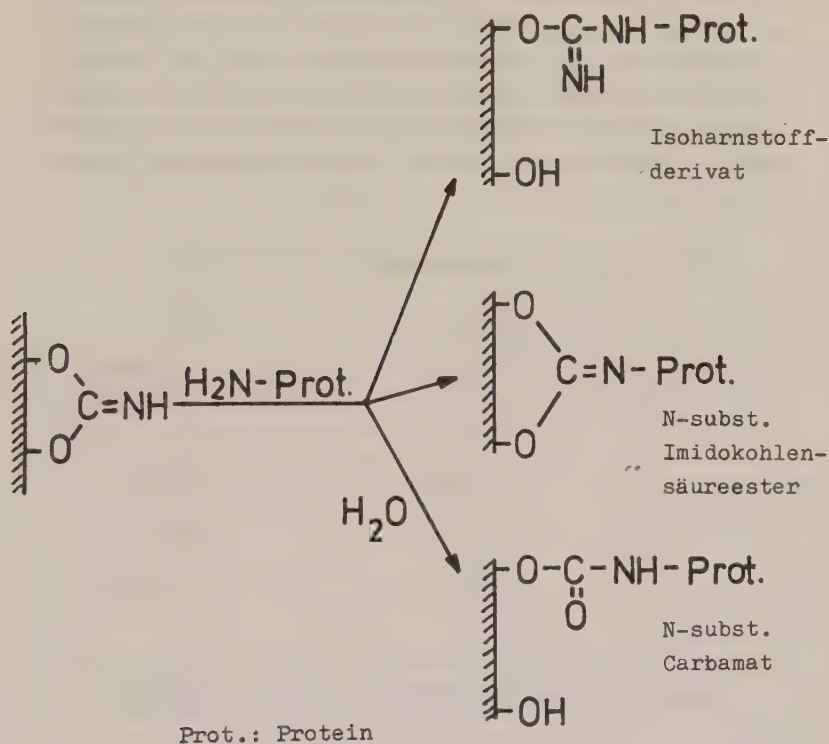
Cellulose fanden als Träger für Enzymfixierungen sehr viel Verwendung (vergl. Einleitung F). Diese Polysaccharide besitzen durch ihre vielen OH-Gruppen sehr gute hydrophile Eigenschaften. Ihre Aktivierung mit BrCN (oder JCN und ClCN) geht auf die Arbeit von Axen, Porath und Ernback zurück (50). Man nimmt an, daß die Aktivierungs- und Enzymfixierungsvorgänge folgendermaßen verlaufen:

- a) Aktivierungsschritt: Bei der Behandlung des Polysaccharides mit BrCN bilden sich, über ein intermediäres Cyanat, die für die Reaktivität verantwortlichen Imidokohlensäureester und inerte Carbamate des Polysaccharides:

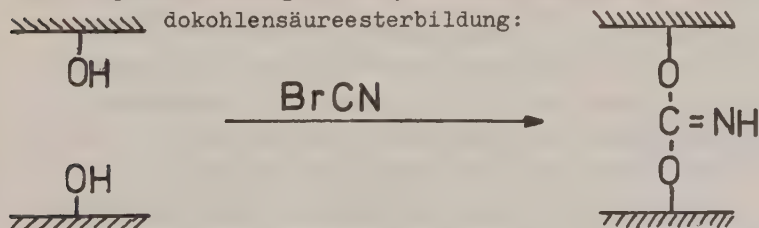


- b) Kupplungsschritt: Der Imidokohlensäureester reagiert mit Aminogruppen des Enzymproteins. Die Hauptprodukte sind N-substituierte Imidokohlensäureester,

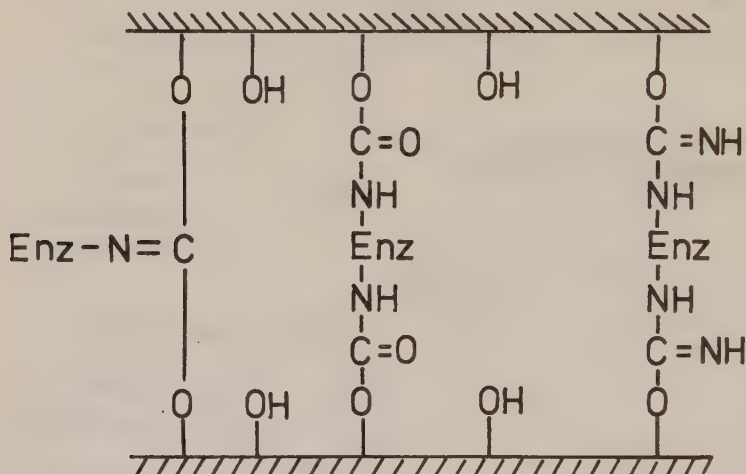
Isoharnstoffderivate und N-substituierte Carbamate:



Während der BrCN-Aktivierung tritt zusätzliche Vernetzung der Sephadex-Gelkugeln ein, offenbar ebenfalls durch Imidokohlensäureesterbildung:



Die Imidokohlensäureesterbindung könnte jedoch bei der Enzymreaktion unter Bildung des N-substituierten Carbamates und des Isoharnstoffderivates geöffnet und damit die Vernetzung aufgehoben werden. Da die zusätzliche Vernetzung jedoch bestehen bleibt, wie aus den Experimenten hervorgeht, ist anzunehmen, daß das Enzym selbst als quervernetzendes Agens auftritt. Ein solches Produkt, unter Annahme aller 3 nach der Enzymumsetzung entstandenen Produkte, hätte folgende Struktur:



2.3.2 Vorversuch: Aktivierung von Sephadex und Enzymfixierung

200 mg in H_2O kurz gequollenes Sephadex G-200 wurden nach Literaturvorschrift (50,52) mit 0,4 g BrCN aktiviert. Als Folge der zusätzlichen Vernetzung durch BrCN unterschied sich das aktivierte Produkt deutlich in seiner Konsistenz vom Ausgangs-Sephadexgel.

Das aktivierte und gewaschene Produkt wurde mit 100 mg Enzym in 1 ml 0,1 n $NaHCO_3$ -Lösung über Nacht bei $4^\circ C$

umgesetzt und die Aktivität nach dem Standardverfahren (vergl. 2.1.4) geprüft. Auf dem DC war diesmal deutlich die Bildung von Phenylalanin zu beobachten, nach Schätzungen waren beträchtliche Enzymmengen gebunden worden. Das Sephadexenzymgel wurde unter Puffer und Substrat gelagert; in gewissen Zeitabständen wurden Aktivitätsprüfungen vorgenommen. Das Produkt zeigte über einen längeren Zeitraum hinweg keinen Aktivitätsverlust.

2.3.3 Serienversuche mit Sephadex

Durch Serienversuche wurden die Optimalbedingungen der Sephadex-BrCN-Enzym-Reaktion ermittelt. Charakterisieren ließen sich die einzelnen Sephadexenzyme durch den Abbau einer Substratlösung unter Standardbedingungen und Vergleich mit dem Abbau durch freies Enzym. Die Messungen wurden fluorometrisch durchgeführt (der Apparat wurde neu geeicht).

2.3.3.1 Analytik

a) Vergleichsansatz mit freiem Enzym:

Eine Enzymreaktion mit der in 7.2.2 angegebenen Substratkonzentration wurde durchgeführt. Die Enzymkonzentration E_0 betrug 3,96 mg/ml Reaktionslösung. Nach 0,25 h Reaktionsdauer waren $x = 0,621 \cdot 10^{-2}$ Mol/l L-Phenylalanin entstanden, was einem Abbau von 55,7 % entspricht.

Die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung k_0' dieser Reaktion beträgt

$$k_0' = (E_0) k_0 \quad (\text{vergl. 1.5.2, S. 19})$$
$$k_0' = \frac{2,3}{t} \log \frac{S_0}{S_t}$$

Für $t = 0,25 \text{ h}$, $S_0 = 1,116 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$ und
 $S_t = S_0 - x = 0,495 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$ ergibt sich:

$$\underline{k_0' = 3,24 \text{ h}^{-1}}$$

b) Standardumsatz für Sephadexenzyme:

Das jeweilige Sephadexenzym wurde auf einer Fritte vom Waschwasser befreit, quantitativ in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 8 ml derselben Substratlösung wie in a) versetzt. Die Reaktion wurde 0,25 h durchgeführt.

Durch Vergleich von k_0' aus a) und der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung k_{fix} der Sephadexenzymreaktion ließ sich angenähert die fixierte Enzymmenge E_{fix} berechnen. Dabei wird vorausgesetzt, daß das gebundene Enzym die gleiche spezifische Aktivität hat wie das freie.

Die Angabe von k_0' in a) bezieht sich auf die Enzymmenge E_0 in 1 ml Reaktionslösung. Ein direkter Vergleich von k_0' und k_{fix} wäre möglich, wenn das Sephadexenzym mit 1 ml Substratlösung versetzt worden wäre. Da aber 8 ml verwendet wurden, gilt:

$k_{\text{fix}} = \frac{1}{8} E_{\text{fix}} k_0 = \frac{2,3}{t} \log \frac{S_0}{S_t}$; $(E_{\text{fix}}) = \frac{E_{\text{fix}}}{8 \text{ ml}} = \text{Enzymkonzentration in mg/ml}$, wobei E_{fix} = fixierte Enzymmenge

k_{fix} der jeweiligen Sephadexenzymreaktion ließ sich aus S_0 , dem durch die Messung ermittelten Umsatz x und der Zeit $t = 0,25 \text{ h}$ ermitteln.

c) Berechnung der gebundenen Enzymmenge E_{fix} :

$$k_0 = \frac{k_0'}{(E_0)} = \frac{8 k_{\text{fix}}}{E_{\text{fix}}}; E_{\text{fix}} = \frac{8 k_{\text{fix}}}{k_0'} (E_0)$$

k_0' und (E_0) aus a), in die Gleichung eingesetzt, ergibt:

$$\underline{E_{\text{fix}} = 9,79 k_{\text{fix}}}$$

2.3.3.2 Ergebnisse der Serienversuche

Für alle Enzymfixierungen wurden 200 mg Sephadex verwendet.

Tabelle 7 (Ziffernerklärung zu den Aktivierungs- und Fixierungsverfahren (A,F) siehe untere Erläuterungen)

A	F	% Abbau	$k_{\text{fix}} \text{ h}^{-1}$	eingesetzte Enzymmenge	fixierte Enzymmenge
1,3	1	36	1,79	100 mg	17,5 mg
1,3	1	7,8	0,67	50 "	6,6 "
1,3	2	56,7	3,33	100 "	32,6 "
1,3	2	25,3	1,16	50 "	11,4 "
2,3	2	48,5	2,63	100 "	48,5 "
2,4	2	77,4	5,9	75 "	57,8 "
2,4	2	71,2	4,96	50 "	48,5 "
2,4	2	42,3	2,19	25 "	21,5 "

A: Aktivierungsverfahren; F: Fixierungsverfahren;
% Abbau: Abbau der Standardsubstratlösung

Die Beschreibung der Aktivierungs- und Fixierungsverfahren findet sich in 9.6.2

Aktivierungsverfahren:

- 1: Aktivierung mit 0,4 g BrCN
- 2: " " 0,8 g BrCN
- 3: nicht vorgequollenes Sephadex
- 4: über Nacht gequollenes Sephadex

Fixierungsverfahren:

- 1: Zugabe des Enzyms in Lösung
- 2: Einrührverfahren

2.4 Native Polysaccharidbasis: Kartoffelstärke als Trägermaterial:

2.4.1 Struktur und Eigenschaften der Stärke

Es war zu untersuchen, ob sich das kostspielige Sephadex-Trägermaterial nicht durch ein natives Polysaccharid, z.B. Stärke, ersetzen ließe. Dieses Material wäre für den präparativen Gebrauch sehr günstig.

Das Stärkekorn besteht - grob gesprochen - aus Amylopektin (Stärkegranulose) als wasserunlöslicher Hüllsubstanz und wasserlöslicher Amylose (Stärkecellulose) im Kern. Amylopektin ist ein stark verzweigtes Polysaccharid, während Amylose aus einem Gemisch unverzweigter Polysaccharidketten besteht.

In kaltem H_2O und organischen Lösungsmitteln ist Stärke unlöslich. Beim Erwärmen mit Wasser beginnt sie bei Temperaturen von $50^{\circ}C$ an unter Bildung von Stärkekleister stark zu quellen. Die Körner nehmen Wasser auf und dehnen sich bis auf das 30 fache aus. Bei weiterer Temperaturerhöhung werden die Körner gesprengt, die Amylose geht in Lösung, während das Amylopektin als Gel zurückbleibt, das beim Abkühlen zu einer Gallerte erstarrt. Amylopektin- und Amylosefraktion lassen sich auf diese Weise trennen (93-95). Der Vorgang des Aufkochens der Stärke wird im folgenden als Verkleisterung bezeichnet. In allen nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde im Lebensmittelhandel erhältliches Kartoffelstärkemehl (Knorr) (als "Stärke" bezeichnet) oder lösliche Stärke verwendet.

2.4.2 Aktivierungsversuch von unverkleisterter Stärke mit BrCN

200 mg Stärke wurden bei R.T. einen Tag lang in Wasser suspendiert, um die Stärkekörner vorzuquellen. Nach Entfernung des Wassers wurde die Stärke mit 0,8 g BrCN

nach dem üblichen Verfahren behandelt und mit Enzym bei 4°C über Nacht umgesetzt. Nach Waschung wurde das Produkt in der üblichen Weise mit Standardsubstratlösung umgesetzt und der Abbau auf DC verfolgt.

Es wurde jedoch nur wenig Phenylalanin freigesetzt, nach Schätzungen anhand der Vergleichsflecken von Phenylalanin waren etwa 0,5 mg aktives Enzym gebunden worden.

Die Erklärung für diese geringe Enzymaufnahme ist wiederum im Quellverhalten der Stärke zu suchen. Wie im vorigen Kapitel erwähnt, tritt Wasseraufnahme und Quellung der Stärkekörner erst bei erhöhter Temperatur ein. Bei R.T. hat das Enzym nur die Möglichkeit, sich mit den Reaktivgruppen der äußeren Amylopektin-Hüllschicht umzusetzen. Eine Diffusion in das Innere des Kornes wird nicht stattfinden, die Stärke ist in dieser Form nicht als hydrophiler Träger zu bezeichnen.

2.4.3 Verkleisterung der Stärke, Vernetzung und Aktivierung der Amylopektinfraktion mit BrCN und Enzymreaktion

Um eine erhöhte Menge an gebundenem Enzym zu erzielen, muß, wie sich als Folgerung aus vorigem Versuch ergibt, die Stärke vor der Aktivierung einem Verkleisterungsprozeß unterworfen werden. Die günstigsten Umsetzungsmöglichkeiten werden dann vorliegen, wenn die Hülle des Stärkekornes durch die Quellung gesprengt ist und die Hüllsubstanz selbst, das Amylopektin, als stark gequollenes Gel vorliegt.

300 mg Kartoffelstärke wurden mit H_2O eine Stunde lang auf 70°C erhitzt. Bei dieser Temperatur und Reaktionsdauer geht die Amylose in Lösung, während das Amylo-

pektin als dünnflüssiges Gel zurückbleibt. Dieses Gel ließ sich nur durch Zentrifugation von der Lösung trennen. Der Aufkochungsvorgang wurde wiederholt, um alle Amylose zu entfernen.

Das zurückgebliebene Gel, also die Amylopektinfraktion, schien aufgrund seiner Konsistenz als Trägermaterial ungeeignet. Bei der Aktivierung von Sephadex mit BrCN traten aber zusätzliche Vernetzungsvorgänge ein (vergl. 2.3.1), die dem ursprünglichen Sephadexgel andere mechanische Eigenschaften verliehen. Es war daher zu untersuchen, ob ähnliche Vernetzungsreaktionen das Amylopektingel in eine brauchbare, filtrierbare Matrix umwandeln würden.

Tatsächlich trat bei der BrCN-Aktivierung eine Gelverfestigung ein, das Gel wurde undurchsichtig und fast körnig, war aber noch gequollen (Gewicht des feuchten, verfestigten Gels: 1,75 g). Das vernetzte Gel ließ sich gut filtrieren und wurde mit 100 mg Enzym umgesetzt (Einrührverfahren). Die Aktivität des Amylopektinenzym und die gebundene Enzymmenge wurden nach dem gleichen analytischen Verfahren ermittelt wie bei den Sephadexenzymen (vergl. 2.3.3.1):

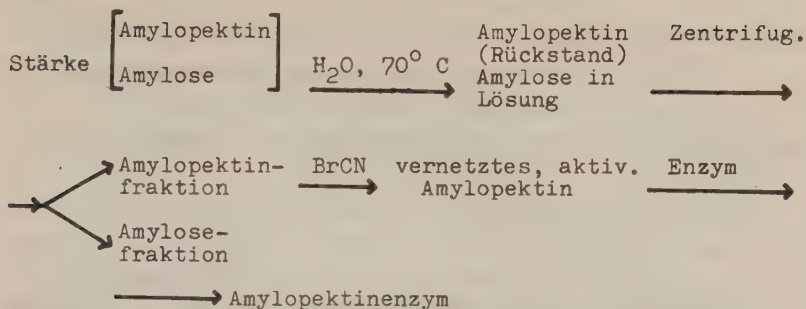
% Abbau der Standardsubstratlösung: 33,5

k_{fix} : 1,63 h⁻¹

gebundene Enzymmenge: 16 mg, also 16 % der eingesetzten Enzymmenge

Auch das Amylopektinenzym besaß gute Filtrationseigenschaften.

Schematische Darstellung des Gesamtvorganges:



Zur Bestimmung der Gewichtsanteile von Amylopektin und Amylose wurde 1 g Stärke eine Stunde lang in H_2O auf $70^{\circ}C$ erhitzt. Die beiden Fraktionen wurden getrennt und die getrockneten Rückstände jeder Fraktion gewogen:

Amylopektin: 0,352 g = 35 %

Amylose: 0,641 g = 64 %

Wird Stärke jedoch, wie spätere Versuche zeigten, nur 10 Min. lang auf $70^{\circ}C$ erhitzt, so ergibt sich 12 % Amylose und 88 % Amylopektin. Offensichtlich geht bei kurzem Erwärmen nur ein Teil der Amylose in Lösung.

2.5 Vernetzung und Aktivierung von Stärke und anderen Polysacchariden mit NaCN und Hypohalogeniten

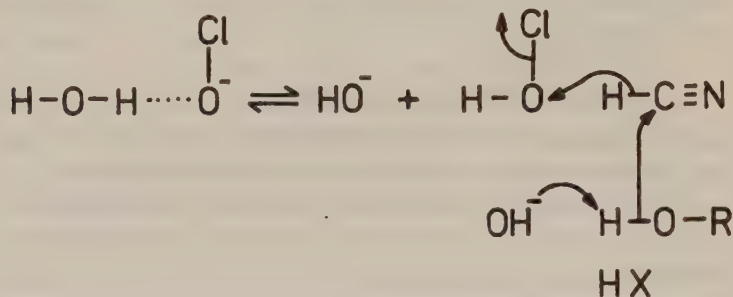
2.5.1 Allgemeines

Ein Vernetzungs- und Aktivierungsverfahren mit billigen Reagentien wurde durch die Behandlung von verkleisterter Stärke mit NaCN und NaOCl in äquimolaren Mengen gefunden (Prof. Brenner, I. Greder). Die Produkte zeigten gute Filtrationseigenschaften und enthielten nach Enzymzusatz ähnliche Enzymmengen gebunden wie bei der BrCN-Methode. Es wurden auch Versuche mit anderen

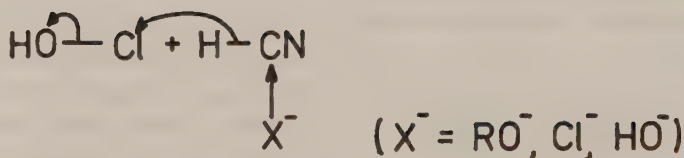
Hypohalogeniten und anderen Polysacchariden durchgeführt.

Die Aktivierung von Polysacchariden mit NaCN/NaOCl verläuft mit größter Wahrscheinlichkeit nicht über intermediäres Halocyan. Zwei mögliche Aktivierungsmechanismen wären:

a)



b)



2.5.2 Serienversuche

Versuche mit verschiedenen Polysacchariden und Hypohalogeniten wurden von Frl. Greder durchgeführt. In den meisten Fällen wurden nur der Vernetzungsgrad und die Filtrationseigenschaften der aktivierten Matrix geprüft. Wenn die ausgewaschene, aktivierte Matrix mit Enzym umgesetzt wurde, wurde das Produkt in einem Standardversuch (8 ml Standardsubstratlösung, 0,5 h Reaktionsdauer, 40° C Reaktionstemperatur) auf Enzymakti-

vität getestet. Das Phenylalanin wurde auf dem DC nachgewiesen und der Umsatz durch Chromatographie von Vergleichslösungen abgeschätzt.

2.5.2.1 Versuche mit Amylopektin und NaOCl

Je 300 mg Kartoffelstärkemehl wurden einmal aufgekocht. Das Amylopektin wurde in der üblichen Weise getrennt, dann mit NaOCl/NaCN aktiviert (alle Reaktionen dieser Art wurden bei 0-5° C durchgeführt). In allen nachstehenden Tabellen sind die verwendeten Absolutmengen an NaCN und NaOCl in mMol angegeben; die Konzentration der NaOCl-Lösung ist als Gewichtsprozent NaOCl ausgedrückt.

NaCN(mMol)	NaOCl(mMol)	% Gehalt der NaOCl-Lösung	Eigenschaften, Enzymfixierung
7,5	7,5	3,5	gut, sofort mit Enz. verrührt, Abbau 10 %
2	3,3	3,5	gut, nach 2,5 h verrührt, 10 % Abbau
1	1,3	3,5	gut, nach 1,5 h verrührt, 15 % Abbau
0,5	0,5	3,5	nicht absaugbar
1	0,7	6,6	gut

2.5.2.2 Versuche mit Amylose und NaOCl

Je 100 mg käufliche, lösliche Stärke (Amylose) wurden in heißem H₂O gelöst, dann auf 5° C gekühlt und mit NaCN/NaOCl behandelt; es trat ebenfalls Vernetzung ein.

NaCN(mMol)	NaOCl-Lös. 7,7 % ig (mMol)	Eigenschaften, Enzymfixierung
2	2	gut, mit Enzym verrührt, 25-30% Abbau
2	4	gut, mit Enzym verrührt, 15-20% Abbau

2 x 5 g Stärke wurden in je 600 ml H₂O aufgekocht; der lösliche Anteil wurde abzentrifugiert und bis fast zur Löslichkeitsgrenze eingengt; es wurden je 10,5 ml dieser Lösung, die ungefähr 100 mg Amylose enthielten, verwendet.

NaCN(mMol)	NaOCl-Lös. 10,5 % ig(mMol)	Eigenschaften
1	1	gut
2	2	"
4	4,2	"
8	8,4	"

2.5.2.3 Versuch mit verkleisterter, unfraktionierter Stärke

300 mg Stärke wurden aufgekocht, die beiden Fraktionen aber nicht getrennt. Danach wurde die Stärke mit 1 mMol NaCN und 1,15 mMol NaOCl-Lösung (6,6 % ig) versetzt. Die Stärke wurde vernetzt, ließ sich aber schlecht filtrieren. Enzymfixierung: Abbau 5 %

2.5.2.4 Versuche mit Stärke, NaCN und Br₂, J₂ und JCN

a) 1 g bzw. 0,3 g Stärke wurden aufgekocht und die Amylopektinfraktionen verwendet. NaCN wurde zur Stärke gegeben, dann wurden Br₂ bzw. Br₂ in NaOH bei 0-5° C zugegeben.

NaCN(mMol)	Br ₂ (mMol)	Eigenschaften
6 (1 g Stärke)	6,2	gut
1 (0,3 g Stärke)	1, in 1 ml 2 N NaOH ge- löst	nicht filtrierbar

b) mit J_2

Zur Amylopektinfraktion von 300 mg Stärke wurden NaCN, dann J_2 gegeben, und umgekehrt ($0-5^{\circ} \text{C}$).

NaCN (mMol)	J_2 (mMol)	Eigenschaften
1 (vorgelegt)	1	geringe Vernetzung
1	1	" "

c) mit JCN

Zur Amylopektinfraktion von 300 mg Stärke wurde in 4 ml H_2O gelöstes JCN gegeben (pH mit 2 n NaOH am pH-Stat auf 11 gehalten).

JCN (mMol)	Eigenschaften
0,8	nach 40 Min. leichte Vernetz., Braunfärbung
1	"
2	"

2.5.2.5 Versuche mit Agar und NaCN/NaOCl

Agar wurde in H_2O aufgekocht und auf $0-5^{\circ} \text{C}$ gekühlt. Das Gel wurde zerkleinert und die Umsetzung mit NaCN/NaOCl durchgeführt.

NaCN (mMol)	NaOCl-Lös. 10,5 % ig (mMol)	Eigenschaften
4 (200 mg Agar)	7,8	gut
2 (100 mg Agar)	4,3	"

Ferner:

100 mg Agar (heiß) wurden zur Perleherstellung (107) in gekühlten Äther getropft, mit 2 mMol NaCN und 2 mMol NaOCl-Lösung (7,7 % ig) vernetzt und aktiviert, anschließend mit Enzym verrührt. Das Produkt war gut absaugbar. Enzymfixierung: Abbau 5 %.

2.5.2.6 Versuche mit Sepharose

1 g käufliche Sepharose (Pharmacia, Upsala, Schweden) wurde mit 6 mMol NaCN versetzt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Dann wurde das Produkt durch Zugabe von 12 mMol NaOCl-Lösung (7,7 % ig) vernetzt, aktiviert und mit Enzym verrührt. Das Produkt war gut absaugbar. Enzymfixierung: Abbau 5 %.

2.5.2.7 Versuche mit Dextrin und NaCN/NaOCl

100 mg Dextrin wurden heiß in 10 ml H₂O gelöst, dann auf 5° C gekühlt. Das Produkt wurde mit 2 mMol NaCN und 1,7 mMol NaOCl-Lösung (10,5 % ig) vernetzt. Es war gut absaugbar.

2.5.2.8 Versuche mit Cellulose und NaCN/NaOCl

Je 300 mg Cellulose wurden 1 h lang in H₂O vorgequollen, aktiviert und mit Enzym verrührt.

NaCN (mMol)	NaOCl-Lös. 6,6 % ig (mMol)	Eigenschaften, Enzymfixierung
1 (Avicel) x)	1,2	gut, 3-5 % Abbau
1 (MN) xx)	1,2	gut, 3 % Abbau

x) Cellulose Avicel: Machery, Nagel & Co., Düren

xx) MN-Cellulose: " " "

Je 300 mg Cellulose wurden 2 h lang mercerisiert (in 17,5 % iger NaOH unter N_2). NaOH wurde abzentrifugiert oder mit HCl neutralisiert. Die Cellulose wurde aktiviert und mit Enzym verrührt.

NaCN (mMol)	NaOCl-Lös. 6,6 % ig (mMol)	Eigenschaften, Enzymfixierung
1 (NaOH abzentrifugiert)	2,1	gut, 20-25 % Abbau
1 (NaOH neutralisiert)	2,5	gut, 10-20 % Abbau

Die Enzymumgesetzungen wurden überall nach dem Einrührverfahren durchgeführt.

3. Charakterisierung des stärkefixierten Enzyms

3.1 Großansatz Stärkeenzym

Zur präparativen Substratspaltung und zur Überprüfung der Enzymaktivität über einen längeren Zeitraum hinweg wurde das Stärkeenzym im Großansatz hergestellt. Dazu wurden 10 g Kartoffelstärke nach dem in 2.4.3 geschilderten Verfahren in beide Fraktionen getrennt. Die Amylopektinfraktion wurde mit BrCN vernetzt und aktiviert und mit 1 g Enzym nach dem Einrührverfahren umgesetzt (vergl. 9.7).

Zur Ermittlung der Aktivität und Abschätzung der fixierten Enzymmenge wurde das Stärkeenzym mit 300 ml Substratlösung ($S_0 = 1,116 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Acetylphenylalanin-Na, 10^{-4} m an CoCl_2) in einem Sulfierkolben bei 40°C 0,25 h lang umgesetzt. Die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten k_{fix} und der fixierten Enzymmenge E_{fix} wurde nach dem in 2.3.3.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Abbau der Substratlösung: 23,2 %

k_{fix} : $1,05 \text{ h}^{-1}$

E_{fix} : 385 mg (38,5 % der eingesetzten Enzymmenge)

3.2 Enzymaktivität nach Waschungen mit sauren und basischen Puffern

Verschiedene Autoren reinigen polysaccharidfixierte Enzyme von adsorbiertem Enzym durch Waschen mit Puffern von verschiedenem pH (50-52).

Dem Stärkeenzym wurden 2 kleine Proben gleichen Feuchtgewichts entnommen. Diese wurden auf Fritten überführt.

Probe a)

Acetatpuffer von pH 4 (0,2 m AcOH, 0,036 m NaOH, 10^{-4} m CoCl_2) wurde auf die Fritte gegeben; die Probe wurde in der Pufferlösung suspendiert, die Lösung danach abgesaugt. Dann wurde die gleiche Menge Boratpuffer von pH 10 (0,118 m Na-Borat, 0,041 m NaOH, 10^{-4} m CoCl_2) zur Probe gegeben und analog verfahren.

Danach wurde die Probe, nachdem obige Prozedur 5 x wiederholt wurde, mit Standardsubstratlösung umgesetzt und der Abbau nach dem Fluoreszenzverfahren ermittelt.

Umsatz nach 0,25 h bei 40°C : 0 !

Daraufhin wurde freies Enzym im Acetatpuffer gelöst und dann der Dialyse unterworfen. Die Aktivität des Enzyms wurde geprüft und ergab ebenfalls 0.

Offensichtlich ist das Enzym bei pH 4 denaturiert worden. Die fehlende Aktivität der Stärkeenzymprobe ist somit ebenfalls auf Denaturierung durch den Acetatpuffer zurückzuführen.

Probe b)

Die Probe wurde nur mit Boratpuffer gewaschen und ergab bei der Aktivitätsprüfung 7 % Abbau.

Um Schädigungen des Stärkeenzym durch saure Puffer zu vermeiden, wurden die hergestellten Produkte weiterhin nur mit H_2O und 0,1 m Bikarbonatpuffer (pH 8) gewaschen, da das Enzym bei diesem pH stabil ist. Um Spuren von evtl. adsorbiertem Enzym zu entfernen, wurde ein hergestelltes Stärkeenzym vor Benutzung zu präparativem Abbau oder kinetischen Untersuchungen mit Substrat versetzt. Während der eintretenden Reaktion verlassen adsorbierte Enzympartikel aufgrund ihrer Affinität zum Substrat den Träger und können mit der

Substrat- und Produktlösung ausgewaschen werden.

3.3 Beständigkeit der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Zeit

3.3.1 Abbauprobungen mit präparativen Substratmengen und polarimetrische Verfolgung

Der Stärkeenzym-Großansatz wurde in ein heizbares Reaktionsgefäß mit Rührer und Frittenboden überführt (vergl. 8.3.1). Dort wurden Substratumsetzungen im batch-Verfahren durchgeführt. Der jeweiligen Reaktionslösung wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die Drehwerte gemessen.

Substratlösungen:

- a) $S_0 = 0,0965 \text{ Mol/l}$ Acetyl-L-phenylalanin-Na
Da der Umsatz ohne Fremdpuﬀer am schnellsten erfolgt, wie sich bei den kinetischen Untersuchungen beim freien Enzym ergeben hatte (vergl. 1.5.3.4), außerdem zusätzliche Salze die Isolierung der Produkte erschweren würden, wurde das Substrat in der Na-Salzform verwendet (pH 6,2). Die Lösung war 10^{-4} m an CoCl_2 . Der Enddrehwert der Lösung beträgt $-1,737^\circ$ (vergl. 8.1).

300 ml der Substratlösung wurden jeweils zum Stärkeenzym gegeben und die Reaktion wurde bei 40° C durchgeführt (vergl. unten).

- b) $S_0 = 0,193 \text{ Mol/l}$ Acetyl-L-phenylalanin-Na
Auch hier wurden jeweils 300 ml umgesetzt.

Umsetzungen:

Umsetzungen wurden zuerst mit Lösungen der in a) ange-

gegebenen Substratkonzentration durchgeführt. Eine Spaltungsreaktion dauerte 2 Tage.

1. Umsetz.: letzter gemess.Drehwert - $1,355^{\circ}$ 77% Ums.
2. " : " " " - $1,611^{\circ}$ 92% "
3. " : " " " - $1,681^{\circ}$ 91% "

Ums. bedeutet Umsatz

Die Lösungen wurden zur späteren Isolierung von L-Phenylalanin und Acetyl-D-phenylalanin aufbewahrt. Nach diesem 6-tägigen Gebrauch wurde das Stärkeenzym 4 Wochen lang unter Puffer (0,1 m Bikarbonatlösung) bei 4° C gelagert; danach wurde wieder eine Umsetzung mit der in a) angegebenen Substratkonzentration durchgeführt. Es zeigte sich, daß das Stärkeenzym keinen Aktivitätsverlust erlitten hatte.

4. Umsetz.: letzter gemess.Drehwert - $1,705^{\circ}$ 99% Ums.

Weitere Umsetzungen wurden mit Lösungen der in b) angegebenen Substratkonzentration durchgeführt. Eine Umsetzung dauerte etwa 4 Tage.

5. Umsetz.: letzter gemess.Drehwert - $3,273$ 94% Ums.

6. " : hier war Aktivitätsverlust erkenntlich.

Nach 4 Tagen betrug der letzte Drehwert nur
- $2,289^{\circ}$, was einem Umsatz von 66 % entspricht.

7. Umsetz.: sie wurde wieder mit der in a) angegebenen Substratkonzentration durchgeführt.
Nach 2-tägiger Umsetzung ergab sich der Drehwert
- $1,19^{\circ}$, was einem Umsatz von 68 % entspricht.

Die Umsetzung wurde noch einen Tag weitergeführt bis zum Drehwert - $1,452$, was einem Umsatz von 84 % entspricht.

Das Stärkeenzym wies somit nach fast 3-wöchiger Beanspruchung und 4-wöchiger Lagerung noch eine Aktivität von etwa 65 % der Ausgangsaktivität auf.

Die Abnahme der Aktivität ist wahrscheinlich auf die nicht ganz sachgemäße Waschung des Stärkeenzym mit Pufferlösung nach einem beendeten Zyklus und auf die lange Lagerung unter Pufferlösung zurückzuführen. Die dadurch bedingten Milieuänderungen wirken sich ungünstig auf das Enzym aus.

Mit einem analog hergestellten Stärkeenzym wurden etwa 150 Zyklen durchgeführt (private Mitteilung). Dabei wurde das Enzym etwa 1/2 Jahr lang beansprucht. Es wies nach dieser Zeit nur einen Aktivitätsverlust von etwa 20 % auf.

3.4 Auswertung der Abbaukurven

Wie bei der Ermittlung der Michaeliskonstanten gezeigt wurde, unterscheidet sich die Reaktion gemischter 0. und 1. Ordnung bei $S_0 = 0,193 \text{ Mol/l}$ nur wenig von einer Reaktion 1. Ordnung (vergl. 1.5.4). Da keine K_m - und $v_{\max}$ -Bestimmungen vorgenommen werden sollten, wurden die Meßdaten der vorigen Abbaureaktionen als Ergebnisse von Reaktionen reiner 1. Ordnung betrachtet.

Verwendet man statt Konzentrationsangaben Drehwerte, so gilt:

$$\log \frac{\alpha_0}{\alpha_0 - \alpha_t} = 0,43 k t$$

Trägt man $\frac{\alpha_0}{\alpha_0 - \alpha_t}$ auf der Ordinate, t auf der Abszisse

von halblogarithmischen Papier auf, so ergibt sich eine Gerade.

Die Drehwerte der 4. Umsetzung (Tabelle 8, nächste Seite) wurden in dieser Form aufgetragen und ergaben Diagramm 6. Eine Gerade ergeben jedoch nur die Werte bis zu etwa 50 % Abbau, der Rest der Kurve zeigt gekrümmten Verlauf. Die Abnahme der Werte kann jedoch nicht von einer irreversiblen Schädigung der Enzymstärke herrühren, da diese bei der folgenden Umsetzung mit Substratlösung keinen Aktivitätsverlust aufwies (vergl. 3.3.1). Es muß daher angenommen werden, daß die in größerer Menge entstandenen Spaltprodukte hemmend auf das fixierte Enzym wirken; dies wird im folgenden Kapitel beschrieben.

Um die Hemmung, die auch bei dem freien Enzym stattfindet, nicht zur Wirkung kommen zu lassen, wurde der Abbau bei den kinetischen Untersuchungen nur bis 50-60 % durchgeführt. Dann ergeben sich bei den Darstellungen auf halblogarithmischem Papier gute Geraden (vergl. die Kapitel zur K_m -Bestimmung).

3.5 Hemmungsuntersuchungen mit Na-Acetat und Acetyl-D-phenylalanin

Die Untersuchungen wurden mit der Fluoreszenzmethode durchgeführt.

- a) Der Abbau einer Vergleichsreaktion unter Verwendung der Standardsubstratlösung ($S_0 = 1,116 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$) wurde durchgeführt.
- b) Der Abbau der Standardsubstratlösung, die zusätzlich 0,222 m an Na-Acetat war, wurde mit der gleichen Enzymmenge wie in a) durchgeführt.
- c) Der Abbau der Standardsubstratlösung, die zusätzlich 0,222 m an Acetyl-D-phenylalanin-Na war,

Tabelle 8

Werte der 4. Umsetzung (S. 72)

t (h)	$-\alpha_t$	$\frac{\alpha_{\infty}}{\alpha_{\infty} - \alpha_t}$
1	0,156	1,100
1,5	0,237	1,16
2	0,290	1,20
3	0,464	1,36
3,5	0,533	1,44
4	0,600	1,53
4,5	0,646	1,59
5	0,715	1,70
5,5	0,752	1,76
6	0,796	1,85
21,5	1,439	5,83
22,5	1,446	5,97
23,5	1,454	6,14
24,5	1,475	6,64
27,25	1,502	7,40
28	1,510	7,65
29	1,527	8,26
30	1,520	8,40
31	1,542	8,90
32	1,544	9,00

α_t : Drehwert zur Zeit t

α_{∞} : - 1,737°

$\alpha_2 - \alpha_1$

10^3

Abbau des 4. präparativen

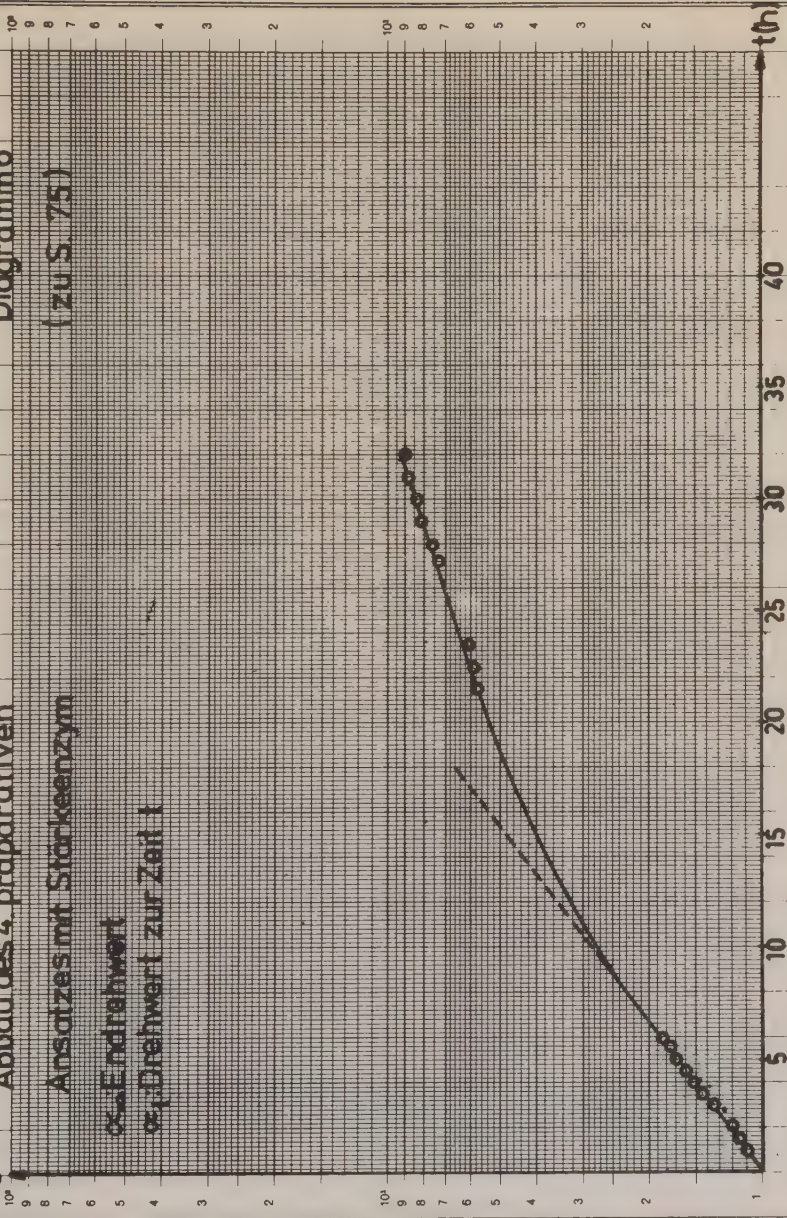
Ansatzes mit Stärkezym

α_2 Endrehwert

α_1 Drehwert zur Zeit t

Diagramm 6

(zu S. 75)



Teilung } 1-100, Einheit } 83.33 mm
 Logar. Division

wurde mit der gleichen Enzymmenge wie in a) durchgeführt.

Der pH betrug bei allen 3 Umsetzungen 6,3.

Auf diese Weise wurden in a) und b) die Konzentrationsverhältnisse simuliert, die bei Verwendung hoher Substratkonzentrationen und nach hohem Abbau vorliegen.

Die anschließende Tabelle zeigt die Resultate der 3 Umsetzungen:

	Konzentrationen nach 0,25 h	% Abbau
Vergleichsreaktion a)	0,0024 Mol/l Na-Acetat 0,0024 Mol/l Acetyl-D-phenylalanin	27,3
Reaktion b)	0,0024 + 0,1116 = 0,114 Mol/l Na-Acetat	14,8
Reaktion c)	0,0024 + 0,1116 = 0,114 Mol/l Acetyl-D-phenylalanin	26,1

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, war der Umsatz nach Zugabe von zusätzlichem Na-Acetat (b) etwa um 50 % geringer als der der Vergleichsreaktion a). Der Umsatz nach Zugabe von zusätzlichem Acetyl-D-phenylalanin war praktisch unverändert geblieben.

Es ist somit ersichtlich, daß die Hemmung des Enzyms im Fall von hohen Anfangssubstratkonzentrationen und Spaltwerten auf den Einfluß des gebildeten Na-Acetats zurückzuführen ist. Ein reiner Konzentrationseffekt (Massenwirkungsgesetz) scheidet aus energetischen Gründen aus.

3.6 Isolierung von L-Phenylalanin und Acetyl-D-phenylalanin

Beim Einengen der Lösungen nach der Enzymumsetzung kristallisierte L-Phenylalanin aus. Dieses wurde abgetrennt und der Vorgang wiederholt, die Fraktionen wurden vereinigt. Die Ausbeuten lagen bei 60 % der Theorie. Diese schlechten Ausbeuten sind darauf zurückzuführen, daß die Mutterlauge nicht vollständig aufgearbeitet wurde. Außerdem wurde ein Teil der Produkte vom Stärkeenzym adsorbiert.

Die Mutterlaugen wurden auf pH 2 angesäuert, Acetyl-D-phenylalanin kristallisierte aus. Die Ausbeuten lagen bei 80 % der Theorie (s. obigen Kommentar). Das Produkt wurde beim Mischungsversuch zur Bestimmung des Enddrehwertes (vergl. 8.1) benutzt. Zur Reinigung wurde es in das Dicyclohexylammonium-Salz überführt, das Acetyl-D-phenylalanin durch Ansäuern des Salzes wieder zurückgewonnen.

$[\alpha]_D$ in MeOH: $-38,2^\circ$ ($c = 1$) Lit.: $-40,3^\circ$

Ein aus käuflichem D-Phenylalanin durch Acylierung mit Acetanhydrid hergestelltes Acetyl-D-phenylalanin (106) wies ebenfalls eine spezifische Drehung von $-38,2^\circ$ in MeOH auf.

3.7 Kinetische Untersuchungen

3.7.1 Allgemeines

Das kinetische Verhalten unlöslicher Enzyme ergibt sich aus der Überlagerung von Trägercharakteristika mit kinetischen Parametern des Enzyms (G.R. Stark, Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports, Acad. Press 1971).

A) Effekte der Diffusionsbegrenzung

Unlösliche Enzympartikel in wäßriger Suspension sind von einer ungerührten Schicht von Lösungsmittel umgeben, deren Dicke von der Rührgeschwindigkeit bestimmt wird. Im Verlauf der Enzymreaktion bildet sich ein Konzentrationsgradient des Substrats um diese Schicht aus. Sättigung mit Substrat erfordert daher größere Substratmengen, als das Enzym in Lösung benötigen würde; der Wert der scheinbaren Michaeliskonstanten K_m steigt daher an (98,99). Bei gequollenen Gelpartikeln, bei denen das Enzym durch die Partikel verteilt ist, bildet sich ein Konzentrationsgradient auch innerhalb der unlöslichen Enzymphase aus (97).

B) Sterische Effekte

Die Verknüpfung des Enzyms mit dem Träger bewirkt, daß das Substrat erschwerten Zugang zum Enzym findet, was besonders bei hochmolekularen Substraten in Erscheinung tritt. Untersuchungen darüber wurden vor allem an Proteasen durchgeführt und eine verminderte proteolytische Aktivität wurde festgestellt (22,40,43).

C) Effekte der chemischen Modifikation

Die kovalente Bindung des Enzyms ruft eine Änderung seiner Gesamtladung, Einflüsse auf die aktive Lage und Störungen der intramolekularen Wechselwirkungen hervor. Diese Effekte können mit niedermolekularen Reagentien simuliert werden (Acylierung, Succinylierung etc. des Enzyms) (99,100). Verschiebungen der pH-Aktivitätskurve des modifizierten Enzyms in den alkalischen Bereich wurden beobachtet. Verschobene pH-Profile wurden auch bei Enzymen beobachtet, die an neutrale Träger gebunden waren, wie p-Aminobenzylcellulose (43) und Leucin-p-Aminophenylalanin-Copolymere (40).

D) Effekte der Mikroumgebung

Ausführlich untersucht wurden die Einflüsse geladener Träger auf das kinetische Verhalten gebundener Enzyme. Goldstein et al. (43,102) zeigten, daß die pH-Aktivitätsprofile polyanionischer Derivate von Proteasen um 1-2,5 pH-Einheiten in den alkalischen Bereich, verglichen mit dem freien Enzym, verschoben waren. Polykationische Träger bewirkten das Gegenteil (102). Diese Anomalien verschwanden bei hoher Ionenstärke.

Bei ungeladenen Trägern, z.B. mit Glutaraldehyd querverknüpftem Trypsin (103) und auf Kollodion gebundener Glukoseoxidase (104), wurde keine pH-Verschiebung festgestellt.

Die scheinbare Michaeliskonstante eines polyanionischen Trypsinderivates war, bei Benutzung von positiv geladenem Substrat, niedriger als die Michaeliskonstante des freien Enzyms (101). Dies wurde auch an polyanionischen Derivaten von Ficin (22) und Bromelain (23) beobachtet, wobei ebenfalls positiv geladenes Substrat benutzt wurde. Hohe Ionenstärken ließen die Störung der Michaeliskonstanten verschwinden.

K_m' -Werte, die denen der freien Enzyme ähnlich waren, wurden für polyanionische und polykationische Derivate von Chymotrypsin und Papain (102,105) bei Benutzung ungeladener Substrate gefunden.

Goldstein et al. (101) zeigten, daß sich diese Phänomene mit einer ungleichen Verteilung von H^+ , OH^- und geladenem Substrat zwischen der Polyelektrolyt-Phase, in der sich das unlösliche Enzym befindet, und der Außenlösung erklären lassen:

$$a_{H^+}^i = a_{H^+}^o \exp(zE\psi/kT) \quad (\text{Boltzmann-Verteilung})$$

$$\Delta pH = pH^i - pH^o = 0,43 \frac{zE\psi}{kT}$$

- $a_{H^+}^i$: H-Ionenaktivität in Polyelektrolyt-Enzymderivat-Phase
 $a_{H^+}^o$: H-Ionenaktivität in der Außenlösung
 ψ : elektrostatisches Potential im Gebiet des geladenen, fixierten Enzympartikels
 E : positive Elektronenladung
 z : positive oder negative gerade Zahl
 k : Boltzmann-Konstante
 T : absolute Temperatur

ΔpH ist die Differenz zwischen dem pH innerhalb der Polyelektrolyt-Enzym-Phase (pH^i) und dem pH der äußeren Lösung (pH^o).

Ebenso läßt sich auch die veränderte Michaeliskonstante K_m' durch ungleiche Verteilung von Substrat zwischen geladenen Enzympartikeln und äußerer Lösung erklären:

$$K_m' = K_m \exp(-ze\psi/kT)$$

$$\Delta pK_m = pK_m' - pK_m = 0,43 \frac{ze\psi}{kT}$$

3.7.2 Ermittlung des pH-Optimums der Enzymstärke

Enzymstärke wurde lyophilisiert. Vom Lyophilisat wurden 8 gleiche Proben, von denen jede somit auch die gleiche Enzymmenge gebunden hat, in Präparatengläser abgewogen. Lösungen der Substratkonzentration von 0,193 Mol/l wurden durch Lösen des Na-Salzes von Acetyl-DL-phenylalanin in der Pufferlösung des jeweiligen pH hergestellt. Für Lösungen mit pH-Werten von 5,8-7,3 wurde ein 0,3 m Sörensenpuffer (10^{-4} m an $CoCl_2$), für Lösungen von pH 8,05 und 8,5 ein 0,5 m Tris-Puffer (10^{-4} m an $CoCl_2$) verwendet (vergl. 1.5.3.3). Gleiche Volumina der Lösungen des jeweiligen pH wurden zu den Enzymstärkeproben in die Reaktionsgefäße gegeben und die Umsetzung bei 40° C unter Schütteln durchgeführt. Nach beendeter und für alle Proben gleicher Reaktionszeit wurden den Reaktionslösungen

Proben entnommen und die Drehwerte gemessen.

pH	α_t nach 5 h
5,8	- 0,539
6,25	- 1,046
6,55	- 1,154
6,8	- 1,127
7,1	- 1,106
7,3	- 0,975
8,05	- 0,496
8,5	- 0,265

Die Drehwerte wurden in Abhängigkeit vom pH aufgetragen und ergaben Diagramm 7. Wiederum ergibt sich eine glockenförmige Kurve (vergl. Diagramm 4). Auch diese Kurve ist verzerrt, da der Abbau nicht nur der Zeit, sondern auch der Substratkonzentration proportional ist. Ein Vergleich mit dem pH-Profil-Diagramm des freien Enzyms zeigt, daß beide Kurven praktisch identisch sind, auch das pH-Optimum liegt in beiden Fällen bei pH 6,55 (verl. 1.5.3.3).

Bei der Stärkeaktivierung wird eine gewisse Anzahl geladener Gruppen in den Träger eingeführt (10), so daß eigentlich eine Verschiebung des pH-Optimums zu erwarten wäre. Gearbeitet wurde aber mit hoher Ionenstärke, die durch den konzentrierten Puffer und die hohe Substratkonzentration bedingt ist, so daß evtl. auftretende pH-Verschiebungen wieder verschwinden würden (s. voriges Kapitel D).

Axen und Ernback (10) untersuchten die pH-Profile von auf Agarose gebundener Enzyme und stellten Verschiebungen in den basischen Bereich fest. Als Substrate wurden ungeladene Derivate von Aminosäureestern benutzt. Die Autoren führen die pH-Verschiebung vor allem auf Protonenbildung bei der Esterspaltung innerhalb der Gelphase,

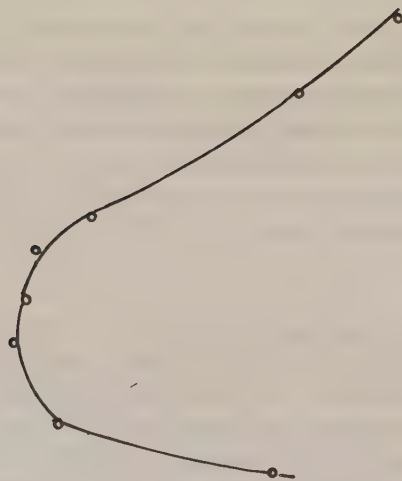
Diagramm 7
(zu S. 81)

pH-Profil
(Enzymstärke)

α_i : Drehwert

$-\alpha_i$

1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1



pH

9

8

7

6

5

wobei der interne pH gegenüber dem externen pH erniedrigt wird, zurück.

Im vorliegenden Fall wird jedoch ein geladenes Substrat benutzt, aus der Säure Acetyl-phenylalanin entsteht Essigsäure, so daß die pH-Verhältnisse innerhalb des Stärkekegels im wesentlichen unverändert bleiben.

Die oben genannten Autoren weisen auch darauf hin, daß die pH-Optima gebundener Enzyme durch Benutzung von Puffern den pH-Optima der freien Enzyme angenähert werden.

3.7.3 Versuche zur Bestimmung von K_m und v_{max}

3.7.3.1 Abbau bei pH 6,2

5 g Stärke wurden, nach einmaligem Aufkochen und Zentrifugieren, mit NaCN und NaOCl vernetzt und aktiviert, dann mit 0,5 g Enzym umgesetzt (vergl. 9.8).

Eine Lösung des Na-Salzes von Acetyl-DL-phenylalanin mit $S_0 = 0,193 \text{ Mol/l}$ in einem 0,3 m Sörensenpuffer von pH 6,2 ($10^{-4} \text{ m an CoCl}_2$) wurde hergestellt und die Reaktion mit dem Stärkeenzym in einem Sulfierkolben bei 40° C durchgeführt. 65 ml Substratlösung waren verwendet worden. Proben wurden zu bestimmten Zeiten entnommen und die Drehwerte mit auf 40° C geheizter Küvette gemessen. Da das Enzym auf dem Träger fixiert ist, findet in der Probe nach der Entnahme aus der Reaktionslösung kein Abbau mehr statt. Die Probelösungen enthielten feine, mit Enzym nicht beladene Stärkepartikel, die die optischen Messungen sehr störten und entfernt werden mußten.

Aus den erhaltenen Drehwerten wurden - unter Benutzung des Enddrehwertes von $-3,3432^\circ$ - die zur K_m - und v_{max} -Bestimmung nötigen logarithmischen - und $\frac{x}{t}$ - Werte berechnet (vergl. 1.5.1)

Aus Tabelle 9 (S. 84) ist ersichtlich: Nicht alle logarithmischen Werte zeigen mit fortlaufender Zeit zunehmende Tendenz, auch nicht alle $\frac{x}{t}$ - Werte fallen mit zunehmender Zeit. Die zur Geradendarstellung nach Walker-Schmidt und zur Ermittlung von K_m und v_{max} brauchbaren Werte wurden unterstrichen. Mit dem Computer wurden anhand der Regressionsgeraden K_m und v_{max} ermittelt:

$$K_m = 0,0361 \text{ Mol/l}$$

$$v_{max} = 0,0138 \text{ Mol/l h}^{-1}$$

K_m wäre somit wesentlich kleiner als K_m des freien Enzyms bei pH 6,2 (0,121 Mol/l). Ein Repetitionsversuch wurde durchgeführt, der jedoch keine zur K_m -Bestimmung brauchbaren Werte ergab, da sich diese wie zu einer Reaktion reiner 1. Ordnung gehörend erwiesen.

Der ermittelte K_m - und v_{max} -Wert ist somit sehr fraglich. Wie schon erwähnt (vergl. 1.5.4), sind bei großem K_m die Unterschiede zwischen der enzymatischen Reaktion gemischter 0. und 1. Ordnung und der Reaktion reiner 1. Ordnung sehr gering. Treten Störungen des Reaktionsverlaufes oder der optischen Messungen auf, so kann eine Reaktion gemischter Ordnung leicht als eine Reaktion 1. Ordnung erscheinen und dadurch die K_m -Bestimmung unmöglich machen. Bei dem errechneten niedrigen K_m -Wert sollten die Unterschiede zwischen beiden Reaktionsordnungen jedoch größer sein. Trotzdem ergaben sich immer wieder Meßwerte, die von einer Reaktion reiner 1. Ordnung herzustammen schienen. Auch die Auftragung der Werte auf halblogarithmischem Papier gegen t ergab eine Gerade (s. Diagramm 8).

Zweifellos ist dieses Verhalten auf die oben erwähnten Störungen zurückzuführen. Als Störungen sind anzusehen:

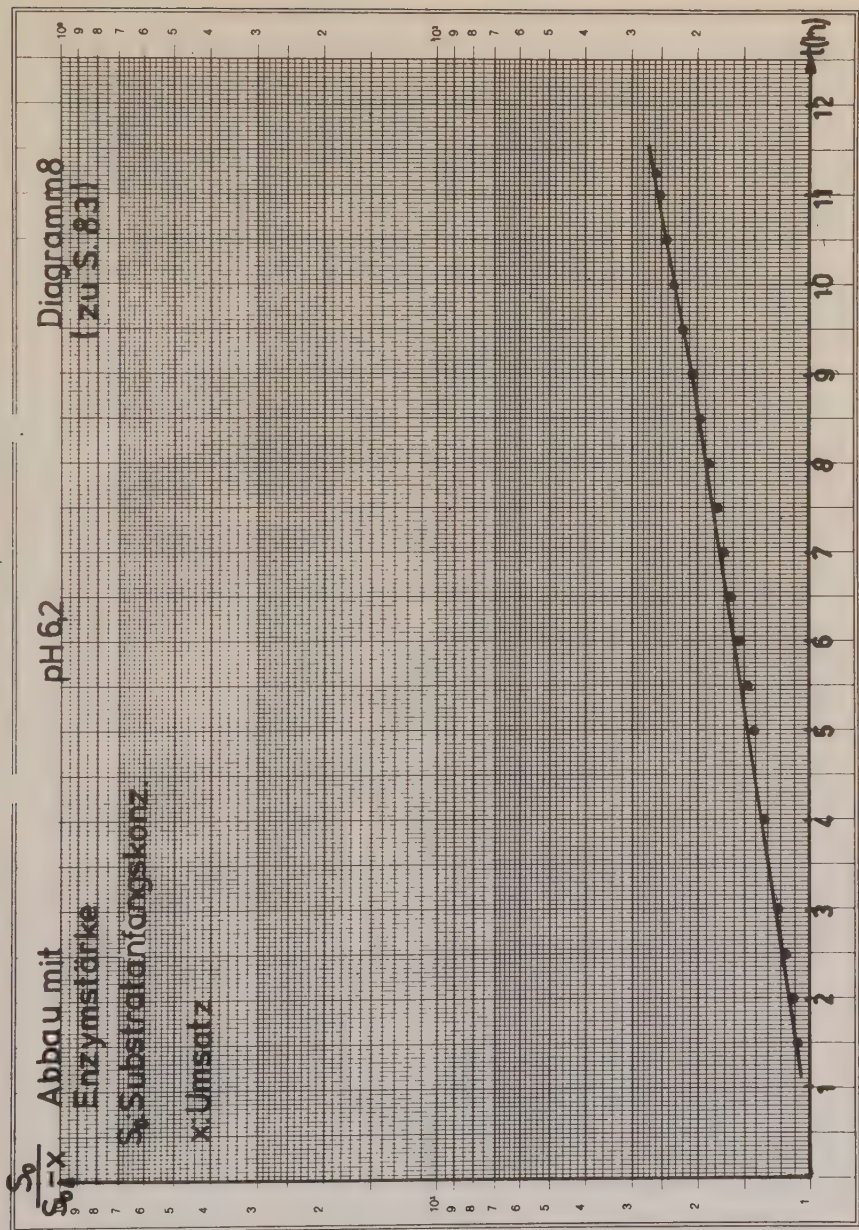


Tabelle 9

Reaktion des Stärkeenzymys bei pH 6,2

t (h)	$-\alpha_t$	$x \cdot 10^{-2}$	$\frac{x}{t} \cdot 10^{-2}$	$\frac{2,3}{t} \log \frac{S_0}{S_t}$	% Abbau
3	0,590	3,425	1,141	0,0651	17,8
4	0,836	4,86	1,212	0,0725	25,2
4,5	1,004	5,84	1,299	0,0803	30,2
5	0,978	5,68	<u>1,136</u>	<u>0,0694</u>	29,4
5,5	1,074	6,24	<u>1,133</u>	<u>0,0711</u>	32,3
6	1,168	6,79	<u>1,131</u>	<u>0,0723</u>	35
6,5	1,273	7,40	1,138	0,0743	38,4
7	1,368	7,94	1,135	0,0757	41,0
7,5	1,458	8,46	<u>1,128</u>	<u>0,0767</u>	43,9
8	1,555	9,03	<u>1,128</u>	<u>0,0788</u>	46,7
8,5	1,640	9,525	<u>1,121</u>	<u>0,0799</u>	49,3
9	1,723	10,01	<u>1,115</u>	<u>0,0814</u>	52,0
9,5	1,803	10,48	<u>1,102</u>	<u>0,0824</u>	54,2
10	1,873	10,89	<u>1,089</u>	<u>0,0830</u>	56,4
10,5	1,956	11,36	1,081	0,0845	58,9
11	2,008	11,62	1,085	0,0838	60,1
11,25	2,048	11,90	1,058	0,0852	61,6

S_0 : 0,193 Mol/l Acetyl-L-phenylalanin

α_t : Drehwert zur Zeit t

x : Mol/l L-Phenylalanin (Umsatz)

S_t : $S_0 - x$

- a) Da die Reaktion nicht wie beim freien Enzym direkt in der Küvette durchgeführt werden konnte, mußten Proben (1,5-2 ml) entnommen und diese Proben eine Zeit lang dem Reaktionsgeschehen entzogen werden.
- b) Es waren möglicherweise nicht mehr sichtbare Stärketeilchen in den Probelösungen anwesend, die die Drehwerte beeinflussen.

Vermutlich ist der K_m -Wert des fixierten Enzyms mit dem des freien Enzyms identisch, da die hohen Ionenstärken der gepufferten Substratlösung evtl. auftretende K_m -Abweichungen beim fixierten Enzym aufheben würden.

Berechnungen der gebundenen Enzymmenge E_{fix} :

Durch Vergleich der Halbwertszeit der Reaktion mit freiem Enzym bei pH 6,2 (vergl. 1.5.3.5) und der Halbwertszeit der Reaktion des Stärkeenzym lässt sich die gebundene Enzymmenge E_{fix} berechnen. Natürlich ist es nicht korrekt, 2 Enzyme, die verschiedene K_m -Werte besitzen, und ihre Reaktionen miteinander zu vergleichen. Eine angenäherte Berechnung der fixierten Enzymmenge sollte jedoch durchgeführt werden:

Enzymmenge (E_0) der Reaktion mit freiem Enzym: 1 mg/ml
 Halbwertszeit t_0 " " " " " : 6,9 h

Halbwertszeit t_1 der Reaktion mit Stärkeenzym, aus K_m und v_{max} nach der auf S. 26 angegebenen Gleichung: 8,8 h

Unter Berücksichtigung des Volumens von 65 ml Substratlösung bei der Reaktion mit Stärkeenzym gilt:

$$\frac{E_{fix}}{65 E_0} = \frac{t_0}{t_1} \quad E_{fix} = \frac{t_0}{t_1} \cdot 65 E_0$$

$E_{fix} = 51 \text{ mg}$ (10 % der eingesetzten Enzymmenge von 500 mg)

3.7.3.2 Abbau bei pH 6,5

Der Abbau mit der Standardkonzentration wurde bei pH 6,5 wiederum mit 65 ml Lösung analog dem vorigen Versuch durchgeführt. Die logarithmischen- und $\frac{x}{t}$ -Werte, die sich aus den Messungen ergaben, ließen sich jedoch nicht zur K_m - und $v_{\max}$ -Berechnung verwenden, da sie sich wie von einer Reaktion reiner 1. Ordnung herstammend verhielten. Eine Repetition dieses Versuches brachte das gleiche Resultat.

EXPERIMENTELLER TEIL

4. Dialyse und Lyophilisierung des Enzyms

8 g des Enzyms wurden in 50 ml H_2O im Becherglas gelöst (tiefbraune Lösung), wobei eine unlösliche Substanz zurückblieb. Die Substanz wurde über eine Fritte abgesaugt und gewaschen, Waschwasser und Enzymlösung wurden vereinigt und in eine Dialysierhülse überführt. Die Dialyse wurde 2 Tage lang mit dest. H_2O (Durchflußmenge etwa 1,5 l/h) in einer Dialysiervorrichtung (mit Exzenter bewegtes, zylindrisches Glasgefäß, das von dest. H_2O durchflossen wurde) durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, daß die Dialysierhülse eine Luftblase enthielt, die sich hin und her bewegte und für Durchmischung der Lösung sorgte.

Die braune Enzymlösung wurde in Lyophilisierkolben überführt (etwa 80 ml pro Kolben) und lyophilisiert, wozu etwa 10 h nötig waren. Das Enzym wurde auf seine Aktivität hin geprüft (DC) und in einer Schraubdeckelflasche bei $-30^{\circ}C$ gelagert.

5. Herstellung von Acetyl-DL-phenylalanin

45 g DL-Phenylalanin (0,27 Mol) wurden in einem 3 l Sulfierkolben mit 109 ml 2 N NaOH versetzt. Unter Rühren und äußerer Eiskühlung wurden 90 ml 2 N NaOH, gefolgt von 9 ml Acetanhydrid, zugegeben, 2 Min. reagieren gelassen, dann die Prozedur wiederholt. Dieser Vorgang wurde insgesamt 8 x wiederholt, es wurden 720 ml 2 N NaOH (1,44 Mol) und 72 ml Acetanhydrid (0,7 Mol) zugegeben (Reaktionstemperatur $20^{\circ}C$). Nach Entfernung

der Eiskühlung wurde das Reaktionsgemisch 1 h lang stehen gelassen, mit 265 ml 6 N H_2SO_4 angesäuert und über Nacht im Kühlschrank das Produkt auskristallisieren gelassen (weiße Blättchen). Das Produkt wurde auf einer Nutsche von der Reaktionslösung befreit, mit eisgekühltem H_2O gewaschen und aus H_2O umkristallisiert.

Ausbeute: 46,1 g = 82 % d. Theorie

$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$: Ber. C 63,8 %, H 6,3 %
 Gef. C 63,75 %, H 6,32 %

Smp: 149° - 151°C Lit.: $152,5^\circ$ - 153°C

6. Dünnschichtchromatographie

Die Platten wurden mit Kieselgel G 200 bestrichen und 1 h lang bei 120°C getrocknet.

Vergleichslösungen von Phenylalanin, bezogen auf $1,116 \cdot 10^{-2}$ Mol/l, wurden hergestellt:

0,184 g/100 ml Phenylalanin,	5 μl (9,2 γ)	$\cong$ 100 % Abbau
0,14 "	" " (6,9 ")	$\cong$ 75 % "
0,09 "	" " (4,6 ")	$\cong$ 50 % "
0,074 "	" " (3,7 ")	$\cong$ 40 % "
0,046 "	" " (2,3 ")	$\cong$ 25 % "
0,02 "	" " (0,9 ")	$\cong$ 10 % "
0,009 "	" " (0,5 ")	$\cong$ 5 % "

Von der jeweiligen Reaktionslösung, die die Anfangssubstratkonzentration von $1,116 \cdot 10^{-2}$ Mol/l und entweder freies oder fixiertes Enzym enthielt, wurden 5 und 10 μl (Mikrocaps) auf das DC aufgetragen. Nach Laufenlassen mit dem Fließmittel wurde das DC 10 Min. lang dem Föhn ausgesetzt, dann mit Ninhydrinreagenz besprüht und 10 Min. lang bei 120°C im Trockenschrank entwickelt.

Die Sichtbarmachung des Acetyl-phenylalanins mit Tolidin wurde nur bei den Versuchen zur Fließmittelermittlung vorgenommen. Dazu wurde das mit Ninhydrin behandelte, entwickelte DC in eine Chlorkammer gestellt, bis die Ninhydrinflecken ausgebleicht waren. Das Chlor wurde 5 Min. lang mit dem Föhn entfernt und das DC mit Tolidinreagenz besprüht.

7. Fluorometrische Versuche

7.1 Reproduzierbarkeit

a) Konzentrationen

Die Konzentration der Eichlösung von L-Phenylalanin wurde auf die Konzentrationsverhältnisse der späteren Reaktionslösungen abgestimmt.

Konzentration der zur enzymatischen Umsetzung verwendeten Lösung von Acetyl-DL-phenylalanin:

$$4,464 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$$

Konzentration Acetyl-L-phenylalanin:

$$2,232 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$$

Diese Lösung wird als Stammlösung bezeichnet und wurde bei allen Reaktionen, die mit Hilfe der Fluoreszenzmessung verfolgt wurden, benutzt.

Bei den enzymatischen Reaktionen werden gleiche Volumina Stammlösung und wäßrige Enzymlösung zusammengegeben (bei den Reaktionen mit gebundenen Enzymen wurden Volumenteile einer Substratlösung zugegeben, die $2,232 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$ Acetyl-DL-phenylalanin enthielt). Diese Lösung wird als Reaktionslösung bezeichnet und enthält zur Zeit $t = 0$ $1,116 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$ Acetyl-L-phenylalanin (bei Verwendung des freien Enzyms).

Bei der Abbaureaktion wurden der Reaktionslösung zu bestimmten Zeiten 2 ml entnommen und der Analyse unterworfen. Diese 2 ml enthalten nach vollständiger Abbaureaktion:

$2,232 \cdot 10^{-5}$ Mol = 3,687 mg L-Phenylalanin, die Reaktionslösung ist $1,116 \cdot 10^{-2}$ m an Phenylalanin.

Eichlösung:

$1,116 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Phenylalanin

Dieser Lösung wurden jeweils 2 ml entnommen. Diese Probe wurde zur Umsetzung mit Dansylchlorid verwendet. Es lagen nun die gleichen Volumen- und Konzentrationsverhältnisse wie in einer enzymatischen Reaktionslösung vor, bei der 100 % iger Abbau erfolgt war und die 3,687 mg Phenylalanin/2 ml Reaktionslösung enthielt.

b) Reaktion mit Dansylchlorid und Ausschüttelung des basischen Reaktionsgemisches

Zur Standardisierung des Verfahrens wurden spezielle Schüttelgefäße verwendet, die durch einen Motor bewegt wurden. Ihre Beschreibung findet sich in 7.2.1. Die Umsetzungen von 7 gleichen Proben der Phenylalanin-Eichlösung mit je 2 Äquivalenten von Dansylchlorid in acetonischer Lösung wurden direkt in diesen Gefäßen durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug 2 h, es fand ein Puffer von pH 10 (vergl. 7.2.1) Verwendung. Das Volumen jeder Reaktionslösung betrug 6 ml, die Lösung enthielt am Schluß das Salz des Dansylphenylalanins.

Der Überschuß an Dansylchlorid wurde durch Extraktion der Reaktionslösung mit CHCl_3 entfernt. Jedes Reaktionsgemisch wurde 2 x mit 20 ml CHCl_3 ausgeschüttelt und die Fluoreszenz der CHCl_3 -Phasen nach jeder Aus-

schüttelung im Fluorometer gemessen; auch die 2. Extraktionen wiesen noch geringe Fluoreszenz auf. Eine geringe, konstante Fluoreszenz zeigten auch die 3., 4. und 5. Extrakte; sie stellt offenbar einen Blindwert dar, der die weiteren Messungen nicht stört. In der Folge wurde die Extraktion auf 2 Operationen beschränkt.

c) Ansäuerung des Reaktionsgemisches, Extraktion des Dansylphenylalanins und seine fluorometrische Vermessung

Nach Entfernung des Dansylchlorid-Überschusses wurden die Reaktionsgemische auf pH 5 angesäuert, bei den ersten Versuchen durch Zugabe einer gleichen Menge von HCl zu jeder der 7 Lösungen. Jedes Reaktionsgemisch enthielt nun das Dansylphenylalanin als freie Säure, also das gewünschte Reaktionsprodukt. Es wurde mit 20 ml CHCl_3 extrahiert; dieser Extrakt wird als saurer CHCl_3 -Extrakt bezeichnet. Sein Fluoreszenzwert wurde im Fluorometer gemessen.

Die Fluoreszenzwerte der mit HCl angesäuerten 7 Reaktionslösungen stimmten jedoch schlecht überein. Dies war auf pH-Differenzen zurückzuführen. Bei Verwendung eines Puffers (1,36 m an Äpfelsäure, 1,2 m an NaOH) (vergl. 7.2.1) ergaben sich gute Übereinstimmungen:

Skalenteile: 71,0; 71,5; 71,5; 71,5; 71,5; 71,5; 71,5

Der pH betrug in allen Lösungen nach der Ausschüttelung 5,2.

d) Proportionalbereich und Verdünnungsreihe aus einem sauren CHCl_3 -Extrakt

Beim Verdünnen eines sauren CHCl_3 -Extraktes aus vorigen Reaktionen mit reinem CHCl_3 auf die Hälfte zeigte

sich bei der Fluoreszenzmessung ein Ansteigen statt einer Abnahme des Skalenwertes. Das bedeutete, daß der saure CHCl_3 -Extrakt zu konzentriert an Dansyl-phenylalanin ist. Um in den Proportionalitätsbereich des Apparates zu kommen, wurde die Lösung 1 : 400 mit CHCl_3 verdünnt. Blende und Filter wurden neu gewählt (vergl. 7.2.1). Verdünnungen der Ausgangslösung mit CHCl_3 von 1 : 800, 1 : 1600 etc. wurden hergestellt und die Fluoreszenz der jeweiligen Lösung wurde gemessen. Es zeigte sich gute Proportionalität im gewählten Apparatebereich (Aufnahme einer Eichkurve).

e) Verdünnungsreihen aus der Phenylalanin-Eichlösung

Die Konzentration der Eichlösung wird als c_0 bezeichnet. Lösungen von

$$\frac{c_0}{2}, \frac{c_0}{4}, \frac{c_0}{8}, \frac{c_0}{10}, \frac{c_0}{50}, \frac{c_0}{100} \text{ und } \frac{c_0}{200}$$

wurden hergestellt, daraus wurden jeweils 2 ml entnommen und mit Dansylchlorid nach geschildertem Verfahren (vergl. 7.2.1) umgesetzt. Die sauren CHCl_3 -Extrakte wurden auf 1 : 200, 1 : 100, 1 : 50, 1 : 40, 1 : 8, 1 : 4 und 1 : 2 mit CHCl_3 verdünnt. Die Fluoreszenz der jeweiligen Lösungen wurde gemessen. Die Fluoreszenzwerte mußten mit dem Fluoreszenzwert des auf 1 : 400 verdünnten sauren CHCl_3 -Extraktes nach obigem Absatz d) übereinstimmen. Dies war der Fall, erst ab $\frac{c_0}{100}$ traten Abweichungen auf.

Somit ist es möglich, Mengen von 3,687 mg Phenylalanin bis 0,074 mg quantitativ zu ermitteln.

Dansylchlorid kann - bei den späteren Enzymreaktionen - auch mit den Aminogruppen des Enzymproteins reagieren. Das dansylierte Enzym könnte die Fluoreszenzmessungen beeinflussen. Versuche mit einer L-Phenylalanin-Ver-

dünnungsreihe nach obigem Schema, die Enzymzusätze enthielt, wurden durchgeführt. Es ergab sich jedoch keine Veränderung der Fluoreszenzwerte, vermutlich geht das dansylierte Enzym nicht in die CHCl_3 -Phase über.

f) Eichung des Apparates

$25 \mu\text{l}$ des sauren CHCl_3 -Extraktes der Eichlösung mit $c_0 = 1,116 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$ Phenylalanin, mit CHCl_3 auf 10 ml aufgefüllt (Verdünnung 1 : 400), ergaben den Skalenwert 91.

91 Skalenteile $\hat{=}$ $1,116 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$ Phenylalanin

$25 \mu\text{l}$ des sauren Extraktes einer enzymatischen Reaktionslösung mit der in a) angegebenen Substratkonzentration, mit CHCl_3 auf 10 ml aufgefüllt, müssen einen Skalenwert zwischen 0 und 91 Skalenteilen bei Verwendung desselben Filters und derselben Blende ergeben.

Die den Skalenteilen entsprechende Menge an Phenylalanin berechnet sich dann zu:

$$x = \frac{1,116 \cdot 10^{-2}}{91} \quad [\text{gemessene Skalenteile}] \quad \text{Formel 1 a}$$

Ist die bei der Enzymreaktion gebildete Menge Phenylalanin noch gering, so ist es nötig, ein über $25 \mu\text{l}$ liegendes Volumen des sauren CHCl_3 -Extraktes auf 10 ml aufzufüllen, damit sich ein genügend hoher Skalenwert ergibt. Dann berechnet sich die Menge x an Phenylalanin in Mol/l zu:

$$x = 3,066 \cdot 10^{-3} \quad \left[\frac{\text{gemessene Skalenteile}}{\text{Volumen bei Mess. in } \mu\text{l}} \right] \quad \text{Formel 1 b}$$

7.2 Analytische Bestimmungen

7.2.1 Umsetzungen von Proben der Phenylalanin-Eichlösung

Apparaturen: TURNER-Fluorometer, Modell 111, mit automa-

tischer Skalenwertangabe (Drehscheibe), Pyrexglas-Küvette; zur Ausschüttelung wurden lange, zylinderförmige Extraktionsgefäße (l = 16 cm, Ø 3 cm), die durch Motor und Schüttelhebel bewegt wurden, verwendet.

Lösungen:

Lösung 1: 1,116 10^{-2} m Lösung von L-Phenylalanin
(Eichlösung)

Lösung 2: 2,23 10^{-2} m Lösung von Dansylchlorid in unter Zusatz von KMnO_4 destilliertem Aceton; die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

Lösung 3: Pufferlösung für basischen Bereich: Ein Boratpuffer von pH 10 wurde nach Angaben des Biochemischen Taschenbuches (79) hergestellt ($0,3$ m Na_3BO_3 Lösung + $0,1$ N NaOH).

Lösung 4: Pufferlösung für sauren Bereich: 46,26 g Äpfelsäure ($0,345$ Mol) wurden in einen 500 ml Kolben gegeben, dazu 150 ml 4 N NaOH und aufgefüllt. pH = 5,2

Ausführung:

In das Extraktionsgefäß wurden 2 ml Lösung 1, 2 ml Lösung 2 und 2 ml Lösung 3 pipettiert. Das Extraktionsgefäß wurde mit einem Stopfen verschlossen und die Reaktion 2 h lang unter Schütteln durchgeführt. Die anfänglich zitronengelbe Suspension ging allmählich in eine klare Lösung über. Nach beendeter Reaktion wurden 20 ml doppelt dest. CHCl_3 zur Reaktionslösung pipettiert. Es wurde ausgeschüttelt und die CHCl_3 -Phase mit dem überschüssigen Dansylchlorid (untere Phase) ablaufen gelassen; die Extraktion wurde mit weiteren 20 ml CHCl_3 wiederholt. Zur extrahierten wäßrigen Phase wurden 2,5 ml Lösung 4 pipettiert. Es wurde kurz geschüttelt,

dann wurden 20 ml CHCl_3 zur Lösung pipettiert. Nach der Ausschüttelung wies die saure CHCl_3 -Phase grüne Fluoreszenz auf. Einige ml der CHCl_3 -Phase wurden ablaufen gelassen, um das CHCl_3 des basischen Extraktes, das sich noch im Ablaufrohr befand, zu entfernen, dann wurde das restliche, das Dansylphenylalanin enthaltende CHCl_3 in einem verschließbaren Kölbchen aufgefangen. Dieser Lösung wurden 25 μl (Spritze) entnommen, die in ein 10 ml Meßkölbchen überführt wurden. Das Kölbchen wurde mit CHCl_3 aufgefüllt (Verdünnung 1 : 400). Die Fluoreszenz wurde in einer einzigen Küvette gemessen, die in immer der gleichen Position in die Halterung eingeführt wurde. Benutzt wurden der Vorsatzfilter Nr. 817 und die Blende 1.

Das Fluorometer muß 2 h vor den ersten Messungen eingeschaltet werden, dann kann die Nullpunktsjustierung vorgenommen werden. Wichtig ist, daß nach der Entfernung der Küvette nach beendeter Messung die Skalen-scheibe wieder auf 0 zurückgeht.

7.2.2 Umsetzungen von Proben enzymatischer Reaktionslösungen.

a) freies Enzym

Stammlösung Substrat: 0,231 g Acetyl-DL-phenylalanin ($1,116 \cdot 10^{-3}$ Mol) wurden in ein Becherglas eingewogen, mit 0,188 g NaHCO_3 ($2,23 \cdot 10^{-3}$ Mol) und H_2O versetzt, gelöst, in ein 25 ml Meßkölbchen überführt und aufgefüllt. x) pH = 8

Stammlösungen Enzym: Lösungen von 0,3 mg Enzym/ml (Reaktion 1), 1,95 mg Enzym/ml (Reaktion 2) (vergl. 1.4.3) oder 7,92 mg Enzym/ml (vergl. 2.3.3.1) wurden hergestellt. Die letzte Lösung war 10^{-4} m an

x) bei 3.5 enthielt die Lösung kein zusätzliches NaHCO_3 .

CoCl_2 .

Die Meßkölbchen mit den Substrat- und Enzym-Stammlösungen wurden in einem thermostatisierten Wasserbad von 40°C vorgewärmt. 10 ml der Stammlösung Substrat wurden in ein in das Wasserbad tauchendes, verschließbares Kölbchen (Reaktionsgefäß) pipettiert, dann 10 ml der jeweiligen Stammlösung Enzym rasch unter Schütteln des Gefäßes dazupipettiert; der Reaktionsbeginn wurde gestoppt (Stoppuhr). Diese Lösung wird als jeweilige Reaktionslösung bezeichnet ($S_0 = 1,116 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l Acetyl-L-phenylalanin-Na}$).

Zu genau registrierten Zeitpunkten wurden der jeweiligen Reaktionslösung 2 ml Proben entnommen und in jeweils ein Extraktionsgefäß überführt. In diesem Extraktionsgefäß waren 2 ml Boratpufferlösung (Lösung 3, vergl. 7.2.1) und 2 ml Dansylchloridlösung (Lösung 2) kurz vor der Probenentnahme vorgelegt worden, so daß beim Einbringen der Probelösung der Enzymabbau sofort gestoppt wurde. Die Reaktion mit Dansylchlorid und die Fluoreszenzmesungen wurden wie in 7.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Ermittlung des Phenylalanins geschieht hier am besten unter Benutzung der Formel 1 b (S. 93).

b) Sephadex- oder stärkegebundenes Enzym

Stammlösung Substrat: Eine Lösung der halben Konzentration wie in a) wurde verwendet ($S_0 = 1,116 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$). Die Lösung war 10^{-4} m an CoCl_2 .

Das jeweilige Sephadex- oder Stärkeenzym (vergl. 2.3.3.1 und 2.4.3) wurde in einem Präparatenglas mit 8 ml auf 40°C vorgewärmter Substratlösung versetzt und die Reaktion unter langsamem Rühren (Mag-

netrührer) 0,25 h lang (Stoppuhr) bei 40° C durchgeführt. Stammlösung Substrat und Reaktionslösung sind hier also identisch.

Nach beendeter Reaktion wurde die jeweilige Suspension auf eine D2-Fritte überführt und die Lösung rasch in ein Reagenzglas gesaugt. Von dieser Lösung wurden 2 ml entnommen und die Fluoreszenzmessungen analog a) durchgeführt.

8. Polarimetrische Versuche

8.1 Bestimmung des Enddrehwertes

Die Konzentration der zu späteren Enzymreaktionen (Kinetikuntersuchungen) benutzten Stammlösung von Acetyl-DL-phenylalanin betrug 0,772 Mol/l.

Konzentration an Acetyl-L-phenylalanin: 0,386 Mol/l.

Bei den Enzymreaktionen wurden wieder gleiche Volumina der Stammlösung Substrat und der Stammlösung Enzym zusammengegeben. Die Konzentration an Acetyl-L-phenylalanin (S_0) dieser Reaktionslösungen betrug dann 0,193 Mol/l.

Der Enddrehwert, d.h. der Drehwert, dem 0,193 Mol/l L-Phenylalanin und 0,193 Mol/l Acetyl-D-phenylalanin entsprechen, ergibt sich folgendermaßen:

Bei der enzymatischen Einwirkung auf das Substrat entstehen gleichzeitig L-Phenylalanin und Acetyl-D-phenylalanin in äquimolaren Mengen. Löst man daher gleiche Molteile von L-Phenylalanin und Acetyl-D-phenylalanin-Na in einem bestimmten Volumen H_2O , mißt den Drehwert dieser Mischungslösung und rechnet ihn auf die Konzentration einer enzymatischen Reaktionslösung, bei der

100 % iger Umsatz stattgefunden hat, um, so erhält man den Enddrehwert. Hierbei wird angenommen, daß die spezifische Drehung konzentrationsunabhängig ist.

Optisch reines Acetyl-D-phenylalanin wurde aus einer Reaktionslösung, bei der die Umsetzung mit unlöslichem Enzym durchgeführt wurde, isoliert (vergl. 3.6).

a) Mischungslösung:

1 mMol Acetyl-D-phenylalanin + 1 mMol NaHCO_3 } wurden
1 mMol L-Phenylalanin
in einen 10 ml Kolben eingewogen und aufgefüllt.

Dieses Gemisch ist 0,1 m sowohl an L-Phenylalanin als auch an Acetyl-D-phenylalanin-Na.

Drehwert dieses Gemisches bei R.T.: - 1,800°
" " " bei 40° C (spätere Reaktionstemperatur):
- 1,732°

b) Enzymatische Reaktionslösung nach 100 % igem Umsatz:

0,193 m sowohl an L-Phenylalanin als auch an Acetyl-D-phenylalanin-Na. Daraus berechnet sich der Enddrehwert α_∞ (bei 40° C):

$$0,193 : 0,1 = \alpha_\infty : - 1,732^\circ$$

$$\alpha_\infty = - 3,343^\circ$$

Mit Kenntnis von α_∞ läßt sich aus einem beliebigen Drehwert α_t zur Zeit t der Enzymreaktion die Anzahl x Mol/l L-Phenylalanin oder Acetyl-D-phenylalanin berechnen.

α_∞ entspricht 0,193 Mol/l L-Phenylalanin (oder Acetyl-D-phenylalanin)
 α_t " x Mol/l L-Phenylalanin (oder Acetyl-D-phenylalanin)

$$\text{Somit: } x = 0,193 \frac{\alpha_t}{\alpha_\infty} = 0,0577 \alpha_t$$

8.2 Abbauversuche mit freiem Enzym (Kinetikuntersuchungen)

Apperaturen: Polarimeter PERKIN-ELMER 141 mit Digital-anzeiger; mit Umlaufthermostat heizbare Küvette ($d = 10 \text{ cm}$, 1 ml Fassungsvermögen).

Stammlösung Substrat: $1,6 \text{ g}$ Acetyl-DL-phenylalanin ($7,72 \cdot 10^{-3} \text{ Mol}$) wurden im Becherglas mit $0,649 \text{ g}$ NaHCO_3 ($7,721 \cdot 10^{-3} \text{ Mol}$) versetzt. 10^{-4} m CoCl_2 -Lösung oder Pufferlösung wurde dazugegeben. Dann wurde die Lösung in ein 10 ml Meßkölbchen überführt und aufgefüllt. Als Pufferlösungen fanden ein Sörensenpuffer (Gemisch von $0,3 \text{ m}$ KH_2PO_4 + $0,3 \text{ m}$ Na_2HPO_4 -Lösung, beide Lösungen 10^{-4} m an CoCl_2) oder ein Tris-Puffer (Gemisch von $0,05 \text{ m}$ (bzw. $0,5 \text{ m}$) Tris-Lösung + $0,05 \text{ N}$ (bzw. $0,5 \text{ N}$) HCl , beide Lösungen 10^{-4} m an CoCl_2) Verwendung, die nach Angaben des Biochemischen Taschenbuches hergestellt wurden.

Stammlösung Enzym: 2 mg Enzym/ml, in 10^{-4} m CoCl_2 -Lösung oder der Pufferlösung mit dem jeweiligen pH.

Durchführung:

Die beiden Stammlösungen wurden im Wasserbad von 40° C vorgewärmt und 5 ml Stammlösung Substrat in ein in das Wasser tauchende Kölbchen gegeben. 5 ml Stammlösung Enzym wurden dazugegeben und vermischt, die Zeit wurde registriert. Eine Probe der Reaktionslösung wurde mit einer Spritze rasch in die auf 40° C geheizte Polarimeterküvette überführt, die in das auf 0 gestellte Polarimeter eingeführt und befestigt wurde. Die Enzymreaktion lief nun in der Küvette weiter ab; alle Viertelstunden wurde eine Drehwertsablesung vorgenommen. Nach beendeter Reaktion wurde die Nullpunktseinstellung bei herausgenommener Küvette geprüft. Gearbeitet wurde mit hoher Empfindlichkeit und geringer Dämpfung.

8.3 Abbauversuche mit stärkefixiertem Enzym

8.3.1 Umsetzungen mit Stärkeenzym im Großansatz (Beständigkeitsuntersuchungen)

Für die Umsetzungen wurde eine Rührapparatur mit Fritteneinsatz und Heizmantel, an dem ein Umlaufthermostat (Cyclotherm) angeschlossen wurde, benutzt. Das Ablaufen der Lösung durch die Fritte während der Enzymreaktion wurde durch einen Stickstoff-Gegendruck verhindert.

Das gereinigte Stärkeenzym (vergl. 9.7) wurde in H_2O im Becherglas suspendiert und in das auf $40^{\circ}C$ beheizte Rührgefäß überführt, das Wasser ablaufen gelassen (ein Trockensaugen der Enzymstärke muß wegen Enzymschädigung vermieden werden). 300 ml der jeweiligen, auf $40^{\circ}C$ vorgewärmten Substratlösung wurden in das Rührgefäß pipettiert. Die Reaktion wurde unter langsamem Rühren (Motor mit starker Untersetzung) durchgeführt.

Um einen Befall des Stärkeenzyms von Mikroorganismen zu vermeiden, wurden zur Lösung Thymolkristalle gegeben, der Frittenboden wurde auf der Unterseite mit Toluol besprüht. Zur Probenentnahme wurde ein Glasrohr mit Verengung ($\emptyset$ etwa 0,5 cm), vor die ein Wattebausch gesetzt war, verwendet. Die abgesaugte Probelösung wurde in ein Reagenzglas gegeben und von dort mit einer Spritze in die Polarimeterküvette überführt. Nach beendeter, bei R.T. durchgeführter Drehwertmessung (Zeitregistrierung) wurde die Probelösung wieder in das Reaktionsgefäß zurückgegeben.

Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung durch Fortnahme des N_2 -Druckes ablaufen gelassen und zur späteren Produktisolierung aufbewahrt. Zur Enzymstärke

im Rührgefäß wurden weitere 300 ml Substratlösung gegeben (Waschungen der Enzymstärke mit Pufferlösung sind zu vermeiden) und nach diesem batch-Verfahren weitere Umsetzungen durchgeführt.

Gelagert wurde das Stärkeenzym bei 4°C unter Pufferlösung und Thymolzusatz (besser ist jedoch eine Lagerung unter Substrat-oder Produktlösung).

8.3.2 Kinetikuntersuchungen

Ein nach der NaCN/NaOCl-Methode hergestelltes Stärkeenzym (vergl. 9.8) wurde auf eine große Fritte überführt und mit etwa 100 ml der Pufferlösung, in der auch das Substrat gelöst war, gewaschen. Das Stärkeenzym wurde quantitativ in einem 200 ml Sulfierkolben überführt, der in einem thermostatisierten Wasserbad montiert war. Die Substratlösung wurde in dem auf 40°C geheizten Bad vorgewärmt ($S_0 = 0,193\text{ Mol/l}$), dann wurden 65 ml der Lösung in den Sulfierkolben pipettiert. Die Reaktion wurde wieder unter langsamem Rühren durchgeführt. Zu registrierten Zeitpunkten wurden mit der in 8.3.1 beschriebenen Spezialpipette Proben zur Drehwertmessung entnommen. Die Lösung enthielt jedoch feine, nicht mit Enzym - wie eine Überprüfung ergab - beladene Stärkepartikel, die eine Trübung der Lösung bewirkten. Die Drehung trüber Lösungen läßt sich im Polarimeter jedoch nicht ermitteln, deshalb wurde jede Probe-lösung in einem engen Zentrifugenglas mit hoher Tourenzahl 10 Min. lang zentrifugiert. Die gereinigte Lösung wurde mit einer Spritze aufgenommen und in die auf 40°C beheizte Küvette überführt. Verwendet wurde auch eine Filterspritze mit Millipore-Filter; der Filter verstopfte jedoch sehr rasch. Nach beendeter Reaktion wurde der Sulfierkolben mit der Stärkesuspension bei 4°C gelagert (Thymolzugabe).

9. Trägerherstellung

9.1 Sulfochloridharze

9.1.1 Umsetzung eines Ionenaustauschers mit SOCl_2

50 g gereinigtes Dowex 50 X Ionenaustauscherharz wurde im Hochvakuum 20 h lang bei 80°C getrocknet; das Harz enthielt immer noch 18 % H_2O .

- a) 2 g Harz (6,2 mÄq. Sulfogruppen) wurden in einem Kölbchen mit 7,5 ml SOCl_2 (0,103 Mol) versetzt. Die Reaktion wurde 24 h lang unter Rückfluß und langsamem Rühren durchgeführt (das noch im Harz enthaltene H_2O reagiert mit dem im Überschuß vorhandenen SOCl_2 und wurde auf diese Weise entfernt).
- b) Eine analoge Reaktion wurde 2,5 Tage lang durchgeführt.

Nach beendeter Reaktion wurden die Harze, nachdem das SOCl_2 abgesaugt worden war, in einem 250 ml Schlenk-Gefäß mit absolutem Dioxan solange gewaschen, bis die Waschflüssigkeit keinen Gehalt an Cl-Ionen mehr zeigte (AgNO_3 -Test). Die Harze wurden am Hochvakuum bei 80°C getrocknet.

SO_2Cl Harz a): 2,04 mÄq./g

" " b): 2,5 " "

9.1.2 Umsetzung eines Ionenaustauschers mit PCl_5

2 g gereinigtes Dowex 50 W X 2 (Bio Rad) - Harz ($1,04 \cdot 10^{-2}$ mÄq. Sulfogruppen) wurden mit 10,4 g PCl_5 ($5 \cdot 10^{-2}$ Mol) im Mörser verrieben und in ein Bombenrohr überführt. Dieses wurde zugeschmolzen und 4 h lang

auf 110° C erhitzt. Nach dem Öffnen des Bombenrohres wurden so lange Eisstücke zum Gemisch gegeben, bis alles überschüssige PCl_5 zerstört war. Der Inhalt wurde auf eine Fritte überführt und mit H_2O gewaschen; eine Probe wurde im Hochvakuum für die Analytik getrocknet (SO_2Cl : 4,77 mÄq./g), der Rest zur Umsetzung mit Tris verwendet.

9.1.3 Umsetzung von Polystyrol mit ClSO_3H und SOCl_2

a) 10 g Bio-Beads X 4 (4 % DVB) wurden in einem Kölbchen in 50 ml CH_2Cl_2 suspendiert. Unter Rühren wurden innerhalb 5 Min. 0,6 ml ClSO_3H ($9 \cdot 10^{-3}$ Mol), die in 2 ml CH_2Cl_2 gelöst waren, zugetropft. Die Suspension wurde 12 h lang langsam gerührt. Das gewaschene Harz wurde in ein Bombenrohr überführt. Nach Zugabe von 10 ml SOCl_2 (0,14 Mol) wurde das Bombenrohr nach dem Zuschmelzen 20 h lang auf 130° C erhitzt. Das Bombenrohr wurde geöffnet (Kühlung mit Trockeneis/MeOH), das Harz mit CH_2Cl_2 gewaschen und am Hochvakuum bei 80° C getrocknet.

SO_2Cl : 0,85 mÄq./g

b) 4 g Bio-Beads X 1 (1 % DVB) wurden mit 0,24 ml ClSO_3H ($3,65 \cdot 10^{-3}$ Mol), in 2 ml CH_2Cl_2 gelöst, analog a) behandelt. Danach wurde das Harz mit 4,5 ml SOCl_2 (0,62 Mol) analog a) im Bombenrohr umgesetzt.

SO_2Cl : 0,963 mÄq./g

9.1.4 Analytik

Etwa 0,5 g des jeweiligen getrockneten Sulfochloridharzes wurden in einem Kölbchen mit 5 ml Dioxan und 5 ml 2 N NaOH versetzt. Das Kölbchen wurde über Nacht

stehen gelassen.

Harz und Lösung wurden dann auf eine kleine Säule mit Fritte überführt, die über eine Saugvorrichtung direkt auf einem 100 ml Meßkolben aufgesetzt war. Die Lösung wurde in den Meßkolben gesaugt und das Harz auf der Säule mit H_2O gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde ebenfalls in den Meßkolben gesaugt, der nach beendeter Waschung (Überprüfung der Waschlösung durch Na-Flammenfärbung) nach Zugabe von 5 ml konz. HNO_3 aufgefüllt wurde. Der Meßlösung wurden Proben entnommen, die mit 0,01 N $AgNO_3$ -Lösung am automatischen Titrator titriert wurden. Durch das auf der Säule gebliebene Harz wurden etwa 100 ml 1 N HCl laufen gelassen. Mit Hilfe der Flammenfärbung wurde geprüft, ob alles Na entfernt war. Nach Neutralwaschung des Harzes wurde eine 0,05 m NaCl-Lösung (etwa 100 ml) über die Säule laufen gelassen und die aufgefangene HCl/NaCl-Lösung mit 0,01 N NaOH titriert.

9.2 Harze mit Arylaminogruppen

a) Benzidinharz

1 g Sulfochloridharz (vergl. 9.1.3 b, 0,963 mÄq. SO_2Cl/g) wurde mit 1,5 g Benzidin ($7,8 \cdot 10^{-3}$ Mol), das in 15 ml CH_2Cl_2 gelöst war, versetzt. Das Kölbchen, in dem sich die Substanzen befanden, wurde über Nacht geschüttelt; das Harz verfärbte sich grünschwartz. Dann wurde das Harz auf eine kleine Fritte überführt und mit CH_2Cl_2 , Äthanol, 1 N HCl und H_2O gewaschen. Ein Teil des Waschwassers wurde nach Diazotierungsvorschriften behandelt und mit R-Salz gekuppelt. Enthielte das Waschwasser noch Benzidin, so wäre dies aus der Färbung (Diazofarbstoff) der Lösung erkenntlich. Dem am Hochvakuum

getrockneten Harz wurde eine kleine Probe zur N-Bestimmung entnommen.

N: 0,85 mÄq./g

Analog wurde ein 4 % DVB vernetztes Sulfochloridharz (vergl. 9.1.3 a, 0,85 mÄq. $\text{SO}_2\text{Cl/g}$) mit Benzidin umgesetzt.

N: 0,995 mÄq./g

Diazotierung:

300 mg des Harzes wurden in einem Becherglas in 5 ml 2 N HCl suspendiert und zur Quellung über Nacht stehen gelassen. Die Lösung wurde auf 1°C gekühlt, portionsweise wurden 150 mg Na NO_2 ($2,2 \cdot 10^{-3}$ Mol) unter Rühren zugegeben. Das Harz färbte sich dunkelrotbraun. Die Suspension wurde 0,5 h lang gerührt, das Harz auf eine kleine Fritte überführt und mit kaltem H_2O gewaschen. Mit KJ/Stärkepapier wurde das Waschwasser auf Nitrit geprüft.

b) 4,4' Diamino-Diphenylmethan-Harz

300 mg Sulfochloridharz (vergl. 9.1.3 b) wurden mit 1,5 g Arylaminokomponente in 15 ml CH_2Cl_2 analog wie in a) umgesetzt und diazotiert.

N: 0,896 mÄq./g

9.3. Harze mit Isothiocyanatgruppen

300 mg des in 9.2.b) dargestellten Harzes wurden mit 3 ml einer 10 % igen Lösung von Thiophosgen in CCl_4 ($4,3 \cdot 10^{-3}$ Mol) in einem Kölbchen unter Rückfluß umgesetzt. Das Harz wurde am Hochvakuum getrocknet.

9.4 Trisharze

9.4.1 Reaktion von Sulfochloridharzen mit Tris

4 g Tris ($3,8 \cdot 10^{-2}$ Mol) wurden in einem Kölbchen mit 7,5 ml Dioxan und 2,5 ml H_2O versetzt. Tris löste sich nicht vollständig. 2 g feuchtes, nach dem PCl_5 -Verfahren (vergl. 9.1.2) nochmals hergestelltes Sulfochloridharz (4,5 mÄq. SO_2Cl/g) wurden dazugegeben. Die Suspension wurde unter langsamem Rühren 16 h lang auf $70^\circ C$ erhitzt. Tris löste sich dabei vollständig. Dann wurde das Harz gewaschen, am Hochvakuum getrocknet und eine Probe zur N-Bestimmung entnommen.

N: 2,95 mÄq./g

BrCN-Umsetzung:

Etwa 300 mg des feuchten Harzes wurden in ein Becherglas eingewogen. Eine Glaselektrode (pH-Meter), eine Bürette mit 2 N NaOH und ein Thermometer wurden montiert. 2,5 g BrCN ($2,4 \cdot 10^{-2}$ Mol) wurden in 5 ml H_2O : Dioxan -Gemisch 1 : 1 gelöst. 4 ml ($1,9 \cdot 10^{-2}$ Mol BrCN) wurden unter langsamem Rühren zum Harz pipettiert, der pH wurde mit der NaOH aus der Bürette auf 11 gehalten. Eisstückchen wurden zur Suspension gegeben, um einen Temperaturanstieg zu vermeiden. Nach 10 Min. Reaktion blieb der pH konstant, die Suspension wurde auf eine Fritte überführt, die Lösung abgesaugt; das Harz wurde innerhalb von 5 Min. mit H_2O und 0,1 N $NaHCO_3$ -Lösung (10^{-4} m an $CoCl_2$) gewaschen, bis der pH der überstehenden Waschlösung 8 betrug. Dann wurde dem Harz eine kleine Probe entnommen und diese getrocknet. An ihr wurde die N-Bestimmung vorgenommen.

N: 4,2 mÄq./g

9.4.2 Reaktion von Chlormethylharzen mit Tris

1,4 g Chlormethylharz (4,9 mÄq. Cl) wurden in einem Kölbchen in 10 ml Dioxan suspendiert. 4 g Tris ($3,8 \cdot 10^{-2}$ Mol) wurden zugegeben und die Suspension 64 h lang auf 100° C unter Rühren erhitzt. Dann wurde Wasser zur Suspension gegeben, diese auf eine Fritte überführt und das Harz mit H_2O gewaschen. Eine kleine Probe des getrockneten Harzes (Hochvakuum, 80° C) wurde zur N-Analyse gegeben.

N: 2,06 mÄq./g

300 mg des Harzes wurden wie in 9.4.1 geschildert mit 1,9 g BrCN ($1,78 \cdot 10^{-2}$ Mol) umgesetzt. Der pH wurde dabei mit 6 N NaOH auf 11 gehalten.

N: 3,06 mÄq./g

9.5 Polyäthylenglykol-Polystyrol-Harze

9.5.1 Darstellung unter Verwendung von Triäthylamin als Katalysator

1,4 g trockenes Hydroximethylharz (2,5 mÄq. OH) wurden in einem Bombenrohr mit 10 ml getrocknetem Dioxan und 0,25 ml Triäthylamin versetzt. Das Bombenrohr wurde mit einem Stopfen verschlossen und in einer Trockeneis/MeOH-Kältemischung gekühlt.

In einem eisgekühlten Meßzylinder wurden 21 ml ($0,42$ Mol) flüssiges Äthylenoxid aus einer kleinen Bombe aufgefangen, wobei die Bombe mit dem Ventil nach unten gehalten und dann das Ventil geöffnet wurde. Das flüssige Äthylenoxid wurde in das Bombenrohr überführt, dieses unter Kühlung zugeschmolzen und 48 h lang auf 80° C erhitzt. Nach dem Öffnen des Bombenrohres wurde das Harz, dem ein brau-

nes, zähflüssiges Öl beigemischt war, auf einer Fritte mit Dioxan und H_2O gewaschen. Das Öl verschwand bei den Waschprozeduren.

Das gelbliche Harz wurde am Hochvakuum bei 80°C getrocknet und eine kleine Probe zur C, H-Bestimmung entnommen.

300 mg Harz wurden mit 0,5 g BrCN ($4,7 \cdot 10^{-3}$ Mol) nach dem in 9.4.1 geschilderten Verfahren aktiviert.

9.5.2 Darstellung unter Verwendung von Na als Katalysator

Aus einer Ammoniakbombe wurde flüssiges NH_3 gewonnen.

1 g trockenes Hydroximethylharz (1,8 mÄq. OH) wurde in ein kleines Kölbchen eingewogen. Ein CaCl_2 -Trockenrohr wurde aufgesetzt und das Kölbchen in eine Trockeneis/MeOH-Kältemischung gestellt. 34 mg ($1,5 \cdot 10^{-3}$ Mol) in Stücke geschnittenes Na-Metall wurden in das Kölbchen gegeben. Dann wurden etwa 10 ml flüssiges NH_3 in das Kölbchen gegeben. Dieses wurde - bei aufgesetztem Trockenrohr - in der Kältemischung geschüttelt. Nach halbstündigem Schütteln hatte sich alles Na gelöst (Verschwinden der Blaufärbung). Das NH_3 wurde bei R.T. abdampfen gelassen. Um alle Spuren von NH_3 zu entfernen, wurde das Kölbchen mit dem Harz über Nacht in einem Vakuumexsikkator über konz. H_2SO_4 gelagert.

Das Harz wurde in ein Bombenrohr überführt. 2,5 ml getrocknetes Dioxan und 10 ml flüssiges Äthylenoxid (0,21 Mol) wurden in das Bombenrohr gegeben. Das Bombenrohr wurde zugeschmolzen und die Reaktion über Nacht bei 130°C durchgeführt. Danach war die Flüssigkeit im Bombenrohr fast verschwunden, auch herrschte

Unterdruck. Das Harz zeigte erhebliche Volumenvergrößerung.

Das Harz wurde in ein Zentrifugenglas überführt, in 100 ml suspendiert, zentrifugiert, die überstehende trübe Lösung (feine Bruchstücke) abdekantiert und dasselbe mit 100 ml H_2O wiederholt. Nach 5 maligem Zentrifugieren enthielt das Harz keine Bruchstücke mehr und wurde auf einer Fritte mit H_2O und Dioxan nochmals gewaschen. Der Farbton des Harzes war unverändert weiß. Es wurde im Hochvakuum bei $80^{\circ} C$ getrocknet, gewogen und eine kleine Probe zur C, H-Bestimmung entnommen.

Die Umsetzung mit BrCN wurde mit 300 mg Harz und 0,5 g BrCN ($4,7 \cdot 10^{-3}$ Mol) analog dem in 9.4.1 geschilderten Verfahren durchgeführt.

N: 0,24 mÄq./g

9.6 Sephadexenzyme

9.6.1 Aktivierung von Sephadex mit BrCN, Enzymsatz

Der beschriebene Versuch wurde bereits unter den in 9.6.2 beschriebenen Optimalbedingungen (0,8 g BrCN, Vorquellung, Einrührverfahren) durchgeführt.

200 mg Sephadex G 200 (Pharmacia, Upsala) wurden über Nacht im Zentrifugenglas in 100 ml H_2O gequollen. Dann wurde zentrifugiert, das H_2O abdekantiert, das Sephadex über eine Fritte abgesaugt und in einem Becherglas in 4 ml H_2O suspendiert. 0,5 g BrCN wurden in 5 ml H_2O gelöst, 4 ml ($3,8 \cdot 10^{-3}$ Mol) wurden zur Sephadex-Suspension unter Rühren (Magnetrührer des pH-Stat) gegeben; der pH wurde mit 2 N NaOH auf 11,5 unter Benutzung des pH-Stat gehalten. Nach beendeter Reaktion

(Konstanz des pH) wurden weitere 0,4 g BrCN ($3,8 \cdot 10^{-3}$ Mol) fest zugegeben, der pH wurde wiederum auf 11.5 gehalten. Nach beendeter Reaktion (20 Min.) wurde die Sephadex-Suspension auf eine G 2-Fritte überführt und die alkalische Lösung abgesaugt. Das Sephadex wurde mit etwa 100 ml eisgekühltem H_2O und etwa 100 ml eisgekühlter 0,1 N $NaHCO_3$ -Lösung (10^{-4} m an $CoCl_2$) gewaschen. 100 mg Enzym wurden zum feuchten Gel auf der Nutsche gegeben und homogen verrührt. Der Ablauf der Nutsche wurde verschlossen und diese über Nacht bei $4^\circ C$ gelagert (Thymolzugabe). Das nicht gebundene Enzym wurde durch Suspension des Sephadexenzym in 0,1 N $NaHCO_3$ (10^{-4} m an $CoCl_2$) und Zentrifugieren (4 x 250 ml Pufferlösung) entfernt.

Das Sephadexenzym war braun gefärbt.

9.6.2 Aktivierungs- und Fixierungsverfahren

Aktivierungsverfahren:

- 1: 200 mg Sephadex wurden mit 0,4 g BrCN, in 4 ml H_2O gelöst, analog dem in 9.6.1 geschilderten Verfahren aktiviert.
- 2: 200 mg Sephadex wurden mit 0,4 g BrCN, in 4 ml H_2O gelöst, aktiviert. Dann wurden weitere 0,4 g BrCN fest zugegeben (vergl. 9.6.1).
- 3: 200 mg Sephadex wurden 0,5 h lang in 4 ml H_2O gequollen. Dann wurde der Aktivierungsprozeß vorgenommen.
- 4: 200 mg Sephadex wurden im Zentrifugenglas mit 100 ml H_2O versetzt und über Nacht gequollen. Dann wurde das Sephadex abzentrifugiert und das H_2O abdekantiert. Danach wurde der Aktivierungsprozeß vorgenommen.

Fixierungsverfahren:

- 1: Die jeweilige Enzymmenge wurde in 1 ml 0,1 N NaHCO_3 -Lösung (10^{-4} m an CoCl_2) bei $0-4^\circ \text{C}$ gelöst (Präparatenglas). Dann wurde das aktivierte, gewaschene Sephadex zugegeben. Die Umsetzung mit Enzym wurde über Nacht bei $0-4^\circ \text{C}$ unter langsamem Rühren durchgeführt.
- 2: Das aktivierte Sephadex verblieb nach der Waschung auf der Fritte. In das feuchte Gel wurde die jeweilige Enzymmenge eingerührt (vergl. 9.6.1); der Frittenablauf wurde verschlossen und die Fritte über Nacht bei $0-4^\circ \text{C}$ gelagert.

Bei den Serienversuchen (vergl. 2.3.3.2) wurden die verschiedenen Aktivierungs- und Fixierungsverfahren kombiniert.

9.7 Vernetzung und Aktivierung von Stärke mit BrCN (Großansatz), Enzymumsatz

10 g käufliche Kartoffelstärke (Knorr) wurden im Becherglas mit einem l H_2O versetzt und auf einem heizbaren Magnetrührer unter kräftigem Rühren 1 h lang auf 70°C erhitzt. Das Amylopektin gel wurde durch Zentrifugieren (20 Min., 4000 U/Min.) von der in Lösung gegangenen Amylose getrennt. Die Lösung wurde abdekantiert, das zurückgebliebene Gel wieder in das Becherglas überführt und obige Prozedur wiederholt (diese 2. Aufkochung kann auch wegfallen).

Das abzentrifugierte Gel wurde mit H_2O in ein großes Becherglas gespült (Volumen etwa 200 ml) und mit einem Flügelrührer gerührt. 13,3 g BrCN (0,125 Mol) wurden in 140 ml H_2O gelöst und zum Gel gegeben. Der pH wurde mit 2 N NaOH durch den pH-Stat auf 11-11,5

gehalten. Dabei trat flockenartige Verfestigung des Gels durch die Vernetzungsreaktion ein. Nach beendeter Reaktion (pH-Konstanz) wurden weitere 13,3 g BrCN fest zugegeben; der pH wurde wiederum auf 11-11,5 gehalten. Dann wurde das verfestigte Gel auf eine große G 2-Glasfilternutsche überführt, die alkalische Lösung abgesaugt und das Gel mit eisgekühltem H_2O und eisgekühlter 0,1 N $NaHCO_3$ -Lösung (10^{-4} m an $CoCl_2$) gewaschen, bis der pH der überstehenden Waschlösung in der Nutsche 8 betrug. Danach wurde die Waschlösung vollständig abgesaugt. 1 g Enzym wurde zu dem feuchten Gelkuchen in der Nutsche gegeben und homogen verrührt (Einrührverfahren). Der Ablauf der Nutsche wurde verschlossen und diese bei $4^{\circ}C$ über Nacht gelagert (Zugabe von Thymolkristallen). Die Enzymstärke wurde mit 1,5 l eisgekühltem H_2O und 4 l eisgekühlter 0,1 N $NaHCO_3$ -Lösung (10^{-4} m an $CoCl_2$) auf der Nutsche gewaschen. Das Produkt hatte braune Färbung.

Gelagert wird die Enzymstärke am besten bei $4^{\circ}C$ unter Produkt-oder Substratlösung (Zugabe von Thymolkristallen).

9.8 Vernetzung und Aktivierung von Stärke mit NaCN/NaOCl

NaCN-Lösung: 2,25 g NaCN wurden im 25 ml Meßkolben in H_2O gelöst; 10 ml (enthalten 0,9 g = $1,84 \cdot 10^{-2}$ Mol) wurden in eine Bürette gefüllt.

NaOCl-Lösung: 10,5 % ige, wäßrige Lösung von NaOCl ($\rho = 1,22$); 10,6 ml (enthalten 1,37 g = $1,84 \cdot 10^{-2}$ Mol) wurden in eine Bürette gefüllt.

5 g Kartoffelstärke wurden in einem Becherglas mit 600 ml H_2O eine Stunde lang erhitzt ($70^{\circ}C$). Das Gel (etwa 250 ml) wurde abzentrifugiert, in ein großes Becherglas überführt und unter Rühren (Magnetrührer) auf $2^{\circ}C$ ge-

kühlt, nachdem die beiden Büretten, ein Thermometer und eine Glaselektrode (pH-Meter) montiert waren. 1 ml NaCN-Lösung wurde aus der Bürette zugegeben (pH der Suspension: 13), danach 1 ml NaOCl-Lösung aus der anderen Bürette. Mit KJ-Stärkepapier wurde alkalisch geprüft, ob noch kein NaOCl-Überschuß vorlag. Nach diesem Verfahren - 1 ml NaCN-Lösung, gefolgt von 1-1,2 ml Hypochlorit-Lösung und Prüfung mit KJ-Stärkepapier - wurden die restlichen Volumina der beiden Lösungen zusammengegeben. Es wurde immer darauf geachtet, daß kein NaOCl-Überschuß vorlag. Die Temperatur der Lösung wurde mit Eiskühlung unter 10° C gehalten.

Die vernetzte, flockige Stärke wurde auf der Glasfildernutsche mit den üblichen Waschlösungen (vergl. 9.7) gewaschen. 0,5 g Enzym wurden in das feuchte Gel auf der Nutsche eingerührt (Einrührverfahren). Nach Lagerung der Nutsche über Nacht wurde das stärkefixierte Enzym (Produkt) in der üblichen Weise gewaschen. Es besaß braune Färbung.

Zur vollständigen Entfernung evtl. noch adsorbierten Enzyms wurde das Produkt in das in 8.3.1 beschriebene Rührgefäß überführt und mit 200 ml Acetyl-DL-phenylalanin-Na ($S_0 = 0,193 \text{ Mol/l}$) 14 h lang bei 40° C umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde entfernt und das Produkt nochmals mit der üblichen Waschlösung gewaschen.

10. Isolierung von L-Phenylalanin und Acetyl-D-phenylalanin

Die mit dem Großansatz Stärkeenzym (vergl. 9.7) umgesetzten Substratlösungen (vergl. 3.3.1) wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt, bis L-Phenylalanin aus-

zukristallisieren begann. Der jeweilige Kolben mit dem Reaktionsgemisch wurde über Nacht in den Kühlschrank gestellt. L-Phenylalanin wurde über eine Nutsche abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen. Die Mutterlauge wurde nochmals eingeengt, wobei wiederum L-Phenylalanin ausfiel, das wie die 1. Fraktion behandelt wurde. Die Ausbeuten lagen bei 60 % der Theorie.

Die jeweilige Mutterlauge wurde nochmals am Rotationsverdampfer eingeengt und mit 6 N H_2SO_4 angesäuert, wobei Acetyl-D-phenylalanin auszukristallisieren begann. Das jeweilige Gefäß wurde über Nacht in den Kühlschrank gestellt, dann wurden die Kristalle abgesaugt. Die Ausbeuten lagen bei 80 % der Theorie.

1,57 g ($7,6 \cdot 10^{-3}$ Mol) Acetyl-D-phenylalanin wurden durch Erwärmen in Äthanol gelöst. 1, 66 ml Dicyclohexylamin ($8,4 \cdot 10^{-3}$ Mol) wurden zugegeben, wobei die Kristallisation des Salzes sofort einsetzte. Die Kristalle wurden auf eine Nutsche überführt, mit eisgekühltem Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 2,3 g = 76 % der Theorie

Das Salz wurde in H_2O unter Erwärmen gelöst, dann wurden 4 ml 4 N H_2SO_4 zugegeben (HCl ergibt schwer lösliches Hydrochlorid!). Acetyl-D-phenylalanin begann auszukristallisieren; das Gefäß wurde über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die Kristalle wurden abgesaugt, mit kaltem H_2O gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 0,75 g = 61,5 % der Theorie

$[\alpha]_D$ in MeOH (c = 1): $38,2^\circ$ Lit.: $40,3^\circ$

ZUSAMMENFASSUNG

Das angestrebte Ziel - Herstellung einer für präparative Zwecke geeigneten, festkörperfixierten Aminoacylase - ließ sich durch Verwendung von Stärke, die in einen hochgequollenen Zustand überführt, mit BrCN vernetzt und aktiviert wurde, erreichen. Die Aktivierung mit BrCN konnte durch die NaCN/NaOCl-Methode ersetzt werden. Dieses Verfahren ließ sich auf verschiedene Polysaccharide anwenden.

Es wurde auch versucht, Träger auf Polystyrolbasis auf verschiedene Weise zu aktivieren. Diese hydrophoben Materialien ließen sich nicht mit dem Enzym umsetzen - sie demonstrierten jedoch gut die Notwendigkeit der Hydrophilie als einer für Enzymträger notwendigen Eigenschaft. Versuche, Polystyrolharze hydrophil zu machen, wurden unternommen und ergaben u.a. ein Polyäthylenglykol-Polystyrolharz mit hydrophilen Eigenschaften. Fixieren ließ sich das Enzym jedoch auf diesen Träger nicht, vermutlich wegen fehlender, kettenterminaler Hydroxigruppen (Verätherung).

Verschiedene kinetische Parameter, wie die Michaeliskonstante des Enzyms, die Maximalgeschwindigkeit und der Einfluß des pH auf die enzymatische Abbaugeschwindigkeit, wurden ermittelt. Zur Ermittlung von K_m und v_{max} mußte auf das weniger gebräuchliche Darstellungsverfahren von Walker und Schmidt zurückgegriffen werden.

Das Bedürfnis nach einer genauen analytischen Methode führte zu der Entwicklung eines fluorometrischen Meßverfahrens.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) M. Laskowski, R.W. Sealock in P.D. Boyer: The Enzymes, Acad. Press. New-York 1971 Vol. 3, p.p. 375 ff
- (2) H. Fritz, M. Gebhardt, R. Meister, K. Illchmann, K. Hochstrasser, Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 571 (1970)
- (3) P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C.B. Anfinsen, Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 61, 636 (1968)
- (4) I. Kato, C.B. Anfinsen, J. of Biol. Chem., Vol. 244 5849 (1969)
- (5) I.H. Silman, E. Katchalski, Annu. Rev. Biochem. 35, 873 (1966)
- (6) D.H. Campbell, E. Lüscher, L.S. Lerman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 37, 575 (1951)
- (7) S.J. Updike, G.P. Hicks, Nature 214, 986 (1967)
- (8) R. Goldman, O. Kedem, I.H. Silman, S.R. Caplan, E. Katchalski, Biochemistry 7, 486 (1968)
- (9) G.J.H. Melrose, Rev. Pure Appl. Chem. 21, 83 (1971)
- (10) R. Axen, S. Ernback, Europ. J. Biochem. 18, 351 (1971)
- (11) A. Kimura, H. Shirakaki, S. Usami, Chem. Abst. 71, 9899 g (1969)
- (12) C. Schwabe, Biochem. 8 795 (1969)
- (13) A. Traub, E. Kaufmann, Y. Teitz, Anal. Biochem. 28, 469 (1969)
- (14) M.A. Mitz, R.J. Schlüter, J. Am. Chem. Soc. 81, 4024 (1969)
- (15) L.B. Barnett, H.B. Bull, Biochim. Biophys. Acta 36, 244 (1959)
- (16) F.M. Richards, Annu. Rev. Biochem. 32, 268 (1963)

- (17) P. Bernfeld, R.E. Biber, D.M. Watson, *Biochim. Biophys. Acta* 191, 570 (1969)
- (18) E.W. Chappelle, E. Rich, N.H. MacLeod, *Science* 155, 1287 (1967)
- (19) T.M.S. Chang, *Science Tools*, 16; 33 (1969)
- (20) R.P. Patel, S. Price, *Biopolymers* 5, 583 (1967)
- (21) G. Manecke, *Biochem. J.* 107 2 P, (1968)
- (22) W.E. Hornby, M.D. Lilly, E.M. Crook, *Biochem. J.* 98, 420 (1966)
- (23) C.W. Wharton, E.M. Crook, K. Brocklehurst, *Eur. J. Biochem.* 6, 565 (1968 a)
- (24) R. Whittam, B.A. Edwards, K.P. Wheeler, *Biochem. J.* 107, 3 p (1968)
- (25) M.A. Mitz, L.J. Summaria, *Nature* 189, 576 (1961)
- (26) E.M. Crook, K. Brocklehurst, C.H. Wharton in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: *Methods in Enzymology*, Acad. Press. New York 1971, Vol. 19, pp 963 ff.
- (27) W. Brümmer, N. Hennrich, M. Klockow, H. Lang, H.D. Orth, *Europ. J. Biochem.* 25, 129 (1972)
- (28) F. Micheel, J. Evers, *Makromol. Chem.* 3, 200 (1949)
- (29) R. Axen, J. Porath, *Nature* 210, 367 (1966)
- (30) R. Axen, J. Porath, *Acta Chem. Scand.* 18, 2193 (1964)
- (31) H. Brandenberger, *Angew. Chemie* 67, 661 (1955)
- (32) H. Brandenberger, *Helv. Chim. Acta* 40, 61 (1957)
- (33) I.H. Silman, E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.* 35, part II, 873 (1965)
- (34) G. Kay, M.D. Lilly, *Biochim. Biophys. Acta* 198, 276 (1970)
- (35) G. Kay, E.M. Crook, *Nature* 216, 514 (1967)
- (36) N. Grubhofer, L. Schleith, *Z. physiol. Chemie* 297, 108 (1954)

- (37) G. Manecke, K.E. Gillert, *Naturwissenschaften* 42, 212 (1955)
- (38) Geynes, B. Rose, A.H. Schon, *Nature* 181, 1465 (1958)
- (39) E. Riesel, E. Katchalski, *J. Biol. Chem.* 239, 1521 (1964)
- (40) A. Bar-Eli, E. Katchalski, *J. Biol. Chem.* 238, 1690 (1963)
- (41) S.A. Barker, R.J. Somers, R. Epton, *Carbohydrate Research* 8, 491 (1968)
- (42) A. Bar-Eli, E. Katchalski, *Nature* 3, 856 (1960)
- (43) L. Goldstein, *Methods in Enzymol.* 19, 935 (1970)
- (44) A.H. Schon, *Symp. Ser. Immunobiol. Stand.* 4, 51 (1967)
- (45) Y. Levin, M. Pecht, L. Goldstein, E. Katchalski, *Biochem.* 3, 1905 (1964)
- (46) A. Conte, K. Lehmann, *Z. Physiol. Chem.* 352, 533 (1971)
- (47) I.H. Silman, E. Katchalski, *Annu. Rev. Biochem.* 35, 873 (1966)
- (48) H. Fritz, B.M. Gebhardt, E. Fink, W. Schramm, E. Werle, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 305, 129 (1969)
- (49) T.L. Westman, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35, 313 (1969)
- (50) R. Axen, J. Porath, S. Ernback, *Nature* 214, 1302 (1967)
- (51) J. Porath, R. Axen, S. Ernback, *Nature* 215, 1307 (1967)

- (52) P. Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970)
- (53) G. Manecke, H.J. Foerster, Makromol. Chem. 51, 199 (1962)
- (54) G. Manecke, H.J. Foerster, Makromol. Chem. 91, 136 (1966)
- (55) G. Manecke, S. Singer, Makromol. Chem. 37, 119 (1960)
- (56) H.C. Isliker, Ann. N.Y. Acad. Sci. 57, 225 (1953)
- (57) N. Grubhofer, L. Schleith, Naturwissenschaften 40, 508 (1953)
- (58) K. Maekawa, Chem. Abstr. 1968, 69, 83703 e
- (59) N. Weliky, H.H. Weetall, Immunochemistry 2, 293 (1965)
- (60) D.G. Hoave, D.E. Koshland, J. Biol. Chem. 242, 2447 (1967)
- (61) N. Weliky, F.S. Brown, E.C. Dale, Arch. Biochem. Biophys. 131, 1 (1969)
- (62) R.P. Patel, D.V. Lopiekes, S.R. Brown, S. Price, Biopolymers 5, 577 (1967)
- (63) C.K. Glassmeyer, J.D. Ogle, Biochemistry 10, 786 (1971)
- (64) S.A. Barker, A.N. Emery, I.M. Novais, Proc. Biochem. 6 (10), 11 (1971)
- (65) J.K. Inman, H.M. Dintzis, Biochemistry 8, 4074 (1969)
- (66) K. Mosbach, Acta. Chem. Scand. 24, 2084 (1970)
- (67) H.H. Weetall, Science 166, 615 (1969 a)
- (68) T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, Agr. Biol. Chem. 33, 1047 (1969)

- (69) T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, Agr. Biol. Chem. 33, 1053 (1969)
- (70) J.P. Greenstein, M. Winitz, Chemistry of the Amino-Acids, New York, Bd. 3, S. 2173
- (71) C.E. Meyer, J. Biol. Chem. 122, 353, 361 (1937/38)
- (72) B.S. Hartley, V. Massey, Biochim. Biophys. Acta 21, 58 (1956)
- (73) G. Pataki, Techniques of Thin-Layer-Chrom. in Amino Acid and Peptide Chem. S. 145
- (74) S. Blackburn, Amino Acid Determination, New York 1968, S. 173
- (75) B. David, T.C. French, I.M. Buchanan, J. Biol. Chem. 238, 2178 (1963)
- (76) Pataki, Gyorgy, Kung-Tsung-Wang, J. Chromatogr. 37, 499 (1968)
- (77) C. Michaelis, M. Menten, Biochem. Z. 49, 333 (1913)
- (78) G.E. Briggs, J.B.S. Haldane, Biochem. J. 19, 338 (1925)
- (79) Biochem. Taschenbuch II, Rauen, Kuhn, 1964 S. 170 ff.
- (80) The Enzymes, Vol. I, Acad. Press. 1959, S. 49 ff.
- (81) H. Lineweaver, D. Burke, J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
- (82) A.S. Walker, C.L.A. Schmidt, Arch. Biochem. 5, 445 (1944)
- (83) K. Michi, H. Tsuda, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, Vol. 21, No. 1, (1957)
- (84) Gutfreund, Trans. Faraday Soc. 51, 441 (1955)
- (85) Advances in Protein-Chemistry, Vol. XIV, S. 18 (1959)
- (86) Houben-Weyl, Bd. 9, S. 552

- (87) Houben-Weyl, Bd. 9, S. 564
- (88) Houben-Weyl, Bd. 9, S. 572
- (89) Jasnichig, Z. obsc. Chem. 23, 107 (1953)
- (90) P. Cuatrecasas, C.B. Anfinsen, Annu Rev. Biochem. 40, 259 (1971)
- (91) G. Manecke, Die Naturwissenschaften 51, 25 (1964)
- (92) Houben-Weyl, Bd. 14, S. 436
- (93) Houben-Weyl, Bd. 14, S. 899
- (94) K.H. Meyer et al. Helv. Chim. Acta 31, 1536 (1948)
- (95) Schoch, Am. Soc. 64, 2954 (1942)
- (96) G. Stark, Biochem. Aspects of Reactions on Solid Supports, Acad. Press. New York S. 26, (1971)
- (97) R. Goldman, O. Kedem, E. Katchalski, Biochem. 7, 4518 (1968 b)
- (98) W.E. Hornby, M.D. Lilly, E.M. Crook, Biochem. J. 107, 669 (1968)
- (99) R. Axen, P.A. Myrin, J.C. Janson, Biopolymers 9, 401 (1970)
- (100) J. Sri Ram, L. Termimello, M. Bier, F.F. Nord, Arch. Biochem. Biophys. 52, 464 (1954)
- (101) L. Goldstein, Y. Levin, E. Katchalski, Biochem. 3, 1913 (1964)
- (102) L. Goldstein, E. Katchalski, Z. Anal. Chem. 243, 375 (1968)
- (103) F.S.A. Habeb, Arch. Biochem. Biophys. 119, 264 (1967)
- (104) G. Brown, E. Selegny, S. Avrameas, D. Thomas, Biochim. Biophys. Acta 185, 260 (1969)
- (105) L. Goldstein, Fermentation Advances (D. Perman ed) S. 391, Acad. Press. New York (1969)
- (106) V. du Vigneaud, C.E. Meyer, J. Biol.Chem. 98, 304 (1932)
- (107) H. Hjertén, Biochim. Biophys. Acta 72, 393 (1964)

Zusammenfassende Darstellung über unlösliche Enzyme:

G.R. Stark, Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports, Academic Press, New York (1971)

L. Goldstein in S.P. Colowick u. N.O. Caplan:
Methods in Enzymology, Academic Press, New York,
Vol. 19, pp. 935 ff. (1971)

J. Gryszkiewicz, Folia Biologica, Vol. 19 No 1,
S.119 (1971)

H. Lang, N. Hennrich, H.D. Orth, W. Brümmer,
M. Klockow, Chemikerzeitung 11, S. 595 (1972)

H.D. Orth, W. Brümmer, Angew. Chemie 11, Nr. 4,
S. 249 (1972)

LEBENS LAUF

Am 28.4.1944 wurde ich, Klaus Ulrich Schlesinger, in Cottbus (heutige DDR) als Sohn des Textilingenieurs Walter Schlesinger und seiner Ehefrau Waldtraut geb. Richter geboren. Von 1950 - 1956 besuchte ich dort die Grundschule. (Der Übertritt in die Oberschule ist in der DDR erst nach 8 Grundschuljahren möglich.)

1956 siedelten wir in die Bundesrepublik Deutschland nach Augsburg über. In Augsburg trat ich in die Sexta des Realgymnasiums ein und verblieb dort bis 1960. In diesem Jahr verzogen wir in meinen jetzigen Wohnort, Maulburg/Baden. Ich wurde in das Hans-Thoma-Gymnasium in Lörrach eingeschult und machte an diesem 1965 das Abitur (Matura).

Im Sommersemester 1965 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und belegte Chemie als Hauptfach, Mathematik, Physik, physikalische Chemie und Zoologie als Nebenfächer. Im April 1967 bestand ich das 1. Vordiplom (anorganische Chemie, organische Chemie, Mathematik), im April 1968 das 2. Vordiplom (Physik, Zoologie) und im Juni 1970 das Diplomexamen (anorganische Chemie, organische Chemie, physikalische Chemie). Die Arbeit an der vorliegenden Dissertation begann ich unter der Leitung von Prof. M. Brenner im August 1970.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Dozenten:

H. Balli, M. Brenner, R. Conzelmann, H. Erlenmeyer, S. Fallab, C. Grob, P. Huber, P. Läger, H. Nüesch, P. Schiess, H. Seiler, Ch. Tamm, M. Thürkauf, R. Witzinger.

